



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ AKTIVNÍCH LÁTEK MEDU V KOSMETICE

USES OF ACTIVE COMPOUNDS FROM HONEY IN COSMETIC PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Patricie Balášová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1370/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Patricie Balášová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití aktivních látek medu v kosmetice

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Příprava a charakterizace extraktů z vybraných druhů medu
- 2) Testování antioxidačního a antimikrobiálního účinku připravených extraktů ve volné a enkapsulované formě
- 3) Testování možnosti zvýšení antimikrobiálního účinku přidavkem další antimikrobiální složky (Nisin, Lysozym)
- 4) Návrh a testování kosmetického výrobku s obsahem aktivních látek z medu

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Patricie Balášová
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci extraktů a liposomů s obsahem aktivních látek z vybraných typů medu s cílem aplikovat tyto extrakty v kosmetických přípravcích. Extrakce aktivních látek z vybraného materiálu byla v průběhu práce optimalizována, přičemž za nejvhodnější organické rozpouštědlo pro extrakci byl zvolen diethylether. U všech extraktů byl sledován obsah celkových polyfenolů, cukrů a antioxidační aktivita. U finálních vzorků pak byl sledován i obsah flavonoidů. Extrakty byly dále enkapsulovány do liposomů, u nichž byla především sledována antioxidační aktivita, velikost a stabilita.

Extrakty a liposomové částice byly následně aplikovány i do kosmetických přípravků. Byly připraveny krémy a gely, u kterých byl sledován jejich antimikrobiální účinek vůči kmenům *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*. U gelů byl prokázán antimikrobiální účinek, a to především na kmen grampozitivní bakterie – *Micrococcus Luteus*. Z tohoto důvodu byl zvolen ještě jeden testovací kmen – *Propionibacterium acnes*. Na závěr byly vybrané liposomy testovány z hlediska jejich bezpečnosti při kontaktu s humánními buňkami, imortalizovanými keratinocyty HaCat. Nebyl prokázán žádný cytotoxický účinek připravených liposomů a testované materiály je tím pádem možné využít v aplikacích do kosmetiky proti akné.

Klíčová slova

Med, kosmetika, enkapsulace, liposomy, antibakteriální aktivita, antioxidační aktivita

Abstract

The bachelor thesis was focused on the preparation and characterization of extracts and liposomes with active substances from chosen types of honey with the aim to apply these extracts to the cosmetic products. The extraction of active substances from chosen material was optimized during the work. As the most suitable organic solvent for extraction was chosen diethyl ether. All the extracts were tested on the content of total polyphenols, sugars and antioxidation activity. The final samples were also tested on the content of flavonoids. Extracts were encapsulated to the liposomes, which were tested especially for their antioxidation activity, size and stability.

Then, extracts and liposome particles were applied to the cosmetic products. Cosmetic creams and gels were prepared and tested for antioxidation activity and antimicrobial activity against the strains *Serratia marcescens* and *Micrococcus luteus*. Antimicrobial activity of gels was proved especially against the strain of grampositive bacterias – *Micrococcus luteus*. From this point of view another one testing strain was chosen – *Propionibacterium acnes*. Finally, the chosen liposomes were tested for their contact with human cells, immortalized keratinocytes HaCat. No cytotoxic effect was observed and tested materials can be applied to cosmetics against acne.

Keywords

Honey, cosmetics, encapsulation, liposomes, antibacterial activity, antioxidation activity

BALÁŠOVÁ, P. *Využití aktivních látek medu v kosmetice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 48 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petra Matouškové, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkanem FCH VUT.

.....

Podpis studenta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí této bakalářské práce Ing. Petře Matouškové, PhD. za její ochotu, velkou trpělivost, skvělé nápady a čas, který mi věnovala v průběhu práce. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Julii Hoové za vstřícnost, ochotu, optimismus a celkovou pomoc při experimentální práci a poté i se zpracováním. V neposlední řadě bych chtěla tímto poděkovat Ing. Natálii Burešové za pomoc při experimentální práci.

Obsah

Abstrakt	1
1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Včelí produkty	8
2.1.1 Včelí jed	8
2.1.2 Včelí vosk	8
2.1.3 Mateří kašička	8
2.1.4 Propolis	9
2.1.5 Včelí med	9
2.2 Antioxidační látky	10
2.3 Antibakteriální látky	11
2.4 Bakteriociny	11
2.4.1 Dělení bakteriocinů	11
2.4.2 Využití bakteriocinů	11
2.4.3 Nisin	12
2.5 Enzymy	12
2.5.1 Mechanismus účinku enzymů	12
2.5.2 Rozdělení enzymů	12
2.5.3 Lysozym	13
2.6 Bakteriální buňka	13
2.6.1 Buněčná stěna bakteriální buňky	14
2.7 Použité bakteriální kultury	15
2.7.1 <i>Serratia marcescens</i>	15
2.7.2 <i>Micrococcus luteus</i>	15
2.7.3 <i>Propionibacterium acnes</i>	15
2.8 Enkapsulace	16
2.8.1 Materiály pro enkapsulaci	16
2.8.2 Liposomy	16
2.8.3 Charakterizace liposomů	17
3 CÍLE PRÁCE	19
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
4.1 Použité chemikálie	20

4.2	Chemikálie a přístroje použité pro práci s buňkami	20
4.3	Použité přístroje a pomůcky	20
4.4	Vybrané medy	21
4.5	Použité mikroorganismy	21
4.6	Příprava extraktů	21
4.6.1	Extrakce kapaliny do kapaliny	21
4.6.2	Příprava vodného a ethanolového extraktu	22
4.6.3	Optimalizace extrakce	22
4.7	Charakterizace extraktů	22
4.7.1	Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona	22
4.7.2	Stanovení polyfenolických látek	23
4.7.3	Stanovení antioxidační aktivity	23
4.7.4	Stanovení flavonoidů	23
4.8	Příprava liposomů	24
4.9	Charakterizace liposomů	24
4.9.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	24
4.9.2	Stanovení antioxidační aktivity	24
4.9.3	Stanovení velikosti a stability částic	24
4.9.4	Sledování dlouhodobé stability	24
4.10	Příprava kosmetických přípravků	25
4.10.1	Optimalizace přípravy gelů	25
4.10.2	Příprava gelů	25
4.10.3	Stanovení antioxidační aktivity gelů	25
4.10.4	Příprava krémů	25
4.10.5	Stanovení antioxidační aktivity krémů	26
4.11	Analýza obsahu fenolických látek pomocí HPLC	26
4.12	Antimikrobiální testy	26
4.12.1	Příprava živného média	26
4.12.2	Kultivace mikroorganismů	26
4.12.3	Bujónová diluční metoda	27
4.13	Testování cytotoxicity	27
4.13.1	Kultivace humánních keratinocytů	27
4.13.2	MTT test cytotoxicity	27

5	VÝSLEDKY A DISKUSE	29
5.1	Optimalizace extrakce	29
5.2	Charakterizace extraktů	30
5.2.1	Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona	30
5.2.2	Stanovení polyfenolických látek	31
5.2.3	Stanovení antioxidační aktivity	32
5.2.4	Stanovení flavonoidů	33
5.3	Charakterizace liposomů	34
5.3.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	34
5.3.2	Stanovení antioxidační aktivity a dlouhodobé antioxidační aktivity	35
5.3.3	Stanovení velikosti a okamžité i dlouhodobé stability částic	36
5.4	Příprava kosmetických přípravků	38
5.4.1	Optimalizace přípravy gelů	38
5.4.2	Stanovení antioxidační aktivity a množství fenolických látek u krémů a gelů	39
5.5	Antimikrobiální testy	39
5.5.1	Koncentrační řady nisinu a lysozymu	39
5.5.2	Antimikrobiální účinek připravených gelů a krémů	40
5.6	MTT test cytotoxicity	41
6	ZÁVĚR	42
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	44

1 ÚVOD

Rostliny jsou schopné zachytávat sluneční energii a díky tomu mají možnost z jednoduchých látek (vody a oxidu uhličitého) vyrábět cukr. Roztok cukru je poté rostlinami nabízen včelám. Až teprve v plástech se tento nektar mění složitým postupem v hustý a vonící med, který je nejznámějším a nejdůležitějším včelím produktem. Med je pro včely nejen zásobní energetickou potravou, kterou potřebují pro svůj život, ale také obsahuje léčivé látky a antioxidanty, které je chrání před bakteriemi. Tyto blahodárné vlastnosti medu může využívat i člověk, který si při správné péči o včely může část jejich medových zásob odebrat pro sebe.

Med má již své místo v každé kuchyni a uplatnění našel i v kosmetice, kde je využíván v pleťových krémech, mýdlech, přípravcích na vlasy, balzámech apod. Med má řadu pozitivních vlastností, především ale pleť hydratuje, což má za důsledek to, že pleť pak zůstává vláčnější, elastičtější a jemnější.

Tato práce byla zaměřena zejména na přípravu a charakterizaci extraktů z medu a dále pak na přípravu liposomů s obsahem aktivních látek z těchto připravených extraktů a jejich charakterizaci. Následovala příprava kosmetických přípravků (gelů a krémů) s obsahem volné a enkapsulované formy extraktů a testování jejich antimikrobiálního účinku na zvolených kmenech bakterií. V práci byly použity tři druhy medů, jednalo se o med lipový, luční a jeden med byl domácí. Hlavním cílem této práce byla izolace a charakterizace fenolických látek medu a testování možnosti jejich aplikace v kosmetických přípravcích s antimikrobiálním účinkem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Včelí produkty

Tyto produkty jsou produkty včely medonosné. Jejich role spočívá především v roli opylovače, avšak jejich úloha je nenahraditelná. V této době jsou včelí produkty velmi významné i pro člověka, mají léčivé účinky, a navíc jsou velmi chutné. Mezi základní produkty včel a jejich následné výrobky patří: včelí med, včelí vosk, včelí jed, květový pyl, mateří kašička, propolis či medovina [1] [2].

2.1.1 Včelí jed

Včelí jed je bezbarvá kapalina charakteristické vůně a kyselé až nahořklé chuti. Je sekretem jedové žlázy včely. Je to směs látek obsahující velké množství bílkovinných látek rozpustných ve vodě. Je složen z histaminu, dopaminu, noradrenalinu, a především z melitinu a apaminu. Melitin je ze všech složek nejdůležitější. Rozkládá bílé a červené krvinky a poškozuje buněčné struktury, což způsobuje odumírání buňky. Apamin působí na centrální nervový systém a mozkovou tkáň.

Včelami je obvykle využíván k obraně při nebezpečí. K aplikaci jedu využívá žihadla, které má na sobě zpětné zoubky. Tyto zoubky zamezují vytažení žihadla a včela si tak celý žihadlový aparát vytrhne z těla ven a po chvíli uhyne.

U citlivých osob se může projevit například alergická reakce na včelí jed. Jed, který se včelám uměle odebírá, je využíván pro farmaceutické účely [1] [2].

2.1.2 Včelí vosk

Vosk je metabolickým produktem voskotvorných žláz. Je produkován mladými dělnicemi od 13. do 17. dne, starším včelám toto ústrojí zakrní. Včely vosk získávají přestavbou cukrů a pylů v trávicím a voskotvorném ústrojí. Včelí vosk je využíván ke stavbě díla – plástů.

Je charakteristický svou aromatickou vůní, není mazlavý a má plastickou konzistenci.

Rozpouští se v organických rozpouštědlech a má vysoký bod tání. Je to vzácná surovina získávána vytavením včelích plástů. Jeho využití dříve spočívalo ve výrobě svící, dnes je využíván především ve farmacii, lékařství (voskové zábaly) a kosmetice (zanechává plet' hebkou a jemnou) [2] [3].

2.1.3 Mateří kašička

Mateří kašička je smetanově žlutá s typickou vůní a nakyslou chutí. Je to výměšek žláz mladých včel, kterým první tři dny krmí dělnice a trubce a včelí královnu po celý její život. Tato potrava je pro ni plnohodnotná a velmi koncentrovaná, což jí umožňuje enormní výkony, které v živočišné říši nemají konkurenci. Je schopna naklást denně až 3 000 vajíček, které tvoří zhruba dvojnásobek její hmotnosti.

Skládá se z vody, bílkovin, tuků a sacharidů. Obsahuje i další látky, jako jsou puriny, purimidy, enzymy, neurohormon – acetylcholin, vitaminy (B, C, vitaminy S-komplexu), minerály (železo, draslík, sodík, mangan, nikl a stopy chromu), biotin, kyselina pantotenová a listová. Jedná se o jediný přírodní zdroj čistého cholinacetátu.

Tento včelí produkt má řadu pozitivních vlivů na člověka. Zvyšuje komplexní výkonnost, působí proti vzniku civilizačních chorob, zpomaluje procesy stárnutí a další. Využívá se

i v lékařství například při průduškovém astmatu, nebo pro léčení stavů po srdečním infarktu a mozkové mrtvici. V kosmetice je prokázán regenerační účinek a zmírnění vrásek. Mateří kašička se dá využít v kombinaci s plástovým pylem i u žen, které mají problém otěhotnět [4].

2.1.4 Propolis

Nazývá se též včelí tmel. Je to látka pryskyřičné povahy, kterou včely vyrábějí z lepkavé hmoty nacházející se na pupenech stromů. Je žlutohnědé, červenohnědé nebo zelenohnědé barvy. V úlech je propolisu poměrně málo, jelikož jeho příprava je náročná a zdlouhavá. Je to velice aromatická směs, která obsahuje vosk, balzámy, éterické oleje a pyl. Díky účinným látkám (flavonoidy, aldehydy, alkoholy atd.) má propolis prokazatelně zřetelné bakteriostatické a baktericidní účinky na řadu bakterií, fungicidní a virocidní účinky aj., čehož včely využívají k vytvoření antibakteriálního prostředí v úlu potíráním stěny úlu a rámy plástů.

Výčet účinků propolisu na lidský organismus je velmi rozsáhlý. Z propolisu jsou k dostání různé přípravky – přírodní čištěný a extrahovaný propolis, propolisová pasta, propolisová tinktura (extrakt propolisu v alkoholu), mast, aj. [5].

2.1.5 Včelí med

Med je sladká hmota, která je včelami zpracována z nektaru nebo medovice. Z květů sbírají včely nektar, což je sladká šťáva vylučovaná rostlinami jako produkt fotosyntézy. Ze stromů sbírají medovici, hustou sladkou šťávu. Tu produkují nejčastěji listové mšice, mery a puklice, které filtrují nasátou mizu a přebytečný sladký roztok (medovici) rozstříkují po větvičkách jehličnatých a listech listnatých stromů. Poté včely nektar nebo medovici přenášejí do úlu, předávají je úlovým včelám, které med zpracovávají. Zpracovávání probíhá pomocí šťáv vylučovaných hltanovými žlázami a odpařováním vody. Med je mikrobiálně stálý, jelikož obsahuje jen malé množství vody.

Z nektaru je včelami vytvořen světlý květový med. Může být donášen jen z jednoho druhu rostliny, nazývá se pak jednodruhový med, např. akátový, malinový, řepkový, lipový apod. Z medovice je vytvářen medovicový med, často nazýván lesní, který se liší jak svou barvou, tak i chutí. Mezi nejběžnější patří např. medovicový smrkový, medovicový jedlový, medovicový dubový, či medovicový modřínový.

Smícháním nektarové a medovicové snůšky se získává med smíšený [1] [2].

2.1.5.1 Složení medu

Med obsahuje především dobře stravitelné cukry. Z velké části je složen z ovocného cukru (fruktózy) a hroznového cukru (glukózy), dále pak malé množství některých dalších jednoduchých cukrů (necelé 2 %). Složených cukrů je v medu obsaženo pod asi 10 %.

Dále množství jednotlivých látek obsažených v medu závisí na zdroji snůšky. Obecně med obsahuje až 1 % minerálů, až 0,6 % enzymů, až 0,5 % aminokyseliny a podobné množství organických kyselin, vitamíny v obsahu zhruba 0,1 %. Nachází se zde i hormony, koloidy, lipidy aj. Med obsahuje asi 14-19 % vody a obecně platí, že čím méně vody obsahuje, tím je med kvalitnější. Medovicový med obsahuje podstatně vyšší podíl minerálních látek, naopak květový med obsahuje kromě výše vyjmenovaných látek i pylová zrna [2] [6].

2.1.5.2 Krystalizace medu

Krystalizace neboli tuhnutí, je přirozený proces. Některé medy, např. řepkový, je ke krystalizaci náchylnější a začne krystalizovat během týdne až dvou. Důvodem je poměr obsahu glukózy k fruktóze. Obsahuje-li med více glukózy, což je běžné u květový medů, krystalují obvykle brzy. Medovicové medy obsahují více fruktózy a mnohem déle zůstávají v tekutém stavu [2].

2.1.5.3 Pozitivní účinky medu na lidský organismus

Med je člověku prospěšný v mnoha různých směrech. Má silný antibiotický účinek, posiluje obranyschopnost organismu a celkově zlepšuje činnost vnitřních orgánů. Zkvalitňuje spánek a slouží k podpoře trávení. Med bývá součástí diety i při léčbě infekční žloutenky, jelikož podporuje funkci jater. Med je vysoce hodnotná potravinu [7].

2.1.5.4 Med v kosmetice

Často dochází k záměně významu pojmů zvlhčovacích a hydratačních vlastností kosmetických přípravků. Pokud se mluví o zvlhčovacích vlastnostech kosmetických přípravků, je přípravek schopen absorbovat nebo zadržovat vlhkost v povrchové vrstvě kůže. Přípravek s hydratačními vlastnostmi má schopnost dodávat nebo obnovovat vodu nejhlubším vrstvám kůže. Mezi látky, které mají hydratační vlastnosti, patří například i med.

Med vykazuje i antibakteriální účinky, což vysvětluje jeho používání při léčbě popálenin a hojení ran. Obecně platí, že med využívá osmotickou sílu cukru, jakožto i jeho zvláčňující vlastnosti ke změkčení pokožky a zvýšení krevního oběhu. Jako přírodní produkt může mít med také toxické složky způsobující alergické reakce. Tomu lze však předejít pravidelnou kontrolou kvality a testováním.

V současnosti je med obsažen v kosmetických přípravcích, jako jsou mýdla, šampony, tělové krémy, krémy proti vráskám, balzámy na rty, opalovací krémy nebo make-up, apod. [8].

2.2 Antioxidační látky

Jako vedlejší produkty buněčného metabolismu vznikají volné radikály. Jsou to kyslíkaté sloučeniny, které pokud nejsou jinými sloučeninami inaktivovány, poškozují buněčný aparát. Nedílnou součástí nemocí jsou oxidační stres a nerovnováha vzniku a odstraňování radikálů. Díky těmto nepříznivým procesům může dojít až k poškození genetické informace buněk a k jejich náhodnému dělení vedoucímu ke vzniku zhoubných novotvarů. Volné radikály se také podílejí na rozvoji arteriosklerózy (poškození stěny tepen ukládáním tuků), a tím pádem zvyšují riziko tvorby krevních sraženin a urychlují proces stárnutí organismu.

Látky, které neutralizují účinek těchto volných radikálů, se nazývají antioxidanty. Přispívají k ochraně organismu, kterou provádí imunitní systém. Mezi antioxidanty lze řadit několik skupin látek, které se navzájem účinkem podporují, jedná se o tzv. synergický účinek.

Pro doplnění antioxidantů je nejlepší formou přirozená pestrá strava bohatá na zeleninu a ovoce, nikoli lékové preparáty. Antioxidanty však obsahuje i čaj nebo med. Mezi významné antioxidanty se řadí vitamín C, vitamín E (hlavní v tucích rozpustný vitamín), karotenoidy, glutathion, CoQ-10 (ubiquinone), polyfenoly či flavonoidy. V medu mezi významné antioxidanty patří organické kyseliny a jejich estery, nebo látky ze skupiny flavonoidů a flavanonů. Ačkoliv med neobsahuje tak velké množství antioxidantů jako například zelenina,

je ho možné srovnat s vínem, jehož množství antioxidantů je značné. Antioxidační kapacita medu je asi desetkrát vyšší, než u bílého vína a je prakticky srovnatelná s vínem červeným. Důležité pro antioxidační účinek je především spektrum antioxidantů, které svoje účinky navzájem umocňují, nikoli jejich množství. Proto z hlediska antioxidačního účinku jsou o něco cennější medy smíšené, pocházející z většího množství druhů rostlin [2] [9].

2.3 Antibakteriální látky

Antibakteriální látky mají různý mechanismus účinku. Mohou ireversibilně poškozovat buněčnou stěnu, narušovat buněčnou membránu, poškozovat nukleové kyseliny nebo proteiny.

V závislosti na mechanismu účinku je dělíme na bakteriostatické a bakteriocidní. Bakteriostatické látky svým působením blokují reversibilně funkci makromolekul (proteinů, nukleových kyselin), aniž by je ničily. Tím pádem zastavují fyziologické funkce a inhibují růst bakterií. Na druhou stranu baktericidní látky svým působením ireversibilně poškozují buněčné komponenty, a tím usmrcují buňky mikroorganismu. Mezi antibakteriální látky patří: kyseliny a jejich estery (benzoová, sorbová, ...), alkoholy (ethanol, isopropanol, ...), aldehydy (glutaraldehyd, formaldehyd, ...), halogeny, těžké kovy, peroxid vodíku, fenoly, kresoly, xylanoly a další [10] [11].

2.4 Bakteriociny

Bakteriociny jsou charakteristické úzkým spektrem účinnosti. Jsou to proteinové nebo peptidické toxiny produkované bakteriemi, které jsou pak zvýhodněny ve svém prostředí. Bakteriociny umožňují eliminovat bakterie stejného nebo podobného druhu, s kterým by bakterie soupeřily o svůj energetický zdroj [12].

2.4.1 Dělení bakteriocinů

Bakteriociny mohou být děleny mnoha způsoby, například podle produkujícího kmene, podle mechanismu eliminace, podle molekulové hmotnosti atd. Bakteriociny produkované gramnegativními bakteriemi se dělí na: coliciny (bakteriociny produkované *E. coli*), microciny a tailociny [12].

Bakteriociny produkované grampozitivními bakteriemi jsou typicky klasifikovány do čtyř tříd.

První třída jsou malé peptidové inhibitory a zahrnuje nisin a ostatní lantibiotika. Druhá třída zahrnuje malé tepelně stabilní proteinové bakteriociny (*enterocin*, *aureocin*), do třetí třídy patří velké tepelně labilní proteinové bakteriociny a do čtvrté pak bakteriociny definované jako komplex bakteriocinů obsahujících tuky a uhlovodíkové části [13].

2.4.2 Využití bakteriocinů

V potravinářství nacházejí uplatnění jako konzervanty a v medicíně se pak využívají jako baktericidní a antivirová léčiva. Uplatnění nachází například při léčbě proti listériím.

Nisin, popřípadě v kombinaci s lysozymem, může brzdit růst mléčných bakterií, což je výhodné při kvašení piva a vína. Tímto se dá regulovat použití nepříliš žádoucího oxidu siřičitého. Nisinu se využívá také k zabránění růstu nežádoucí mikroflóry při výrobě mléčných výrobků [14].

2.4.3 Nisin

Nisin je nejvíce rozšířený a zároveň aplikovaný bakteriocin. Je to přírodní látka složená z 34 aminokyselin s širokou antimikrobiální aktivitou vůči nežádoucí mikroflóře potravin. Existují dvě varianty – nisin A, nisin Z, které se liší pouze aminokyselinou v poloze 27. Bakteriocin nisin je ribozomálně syntetizovaný peptid, řadící se do skupiny lantibiotik.

Je produkován bakterií mléčného kvašení *Lactococcus lactis*. Působí zejména na grampozitivní bakterie, obzvláště na *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* a *Clostridium botulinum*. Jeho působení je umožněno především dostatečnou propustností buněčné stěny pro nisin. Ten vytváří kanálky při procházení cytoplazmatickou membránou, které jsou propustné pro veškeré látky, a tím dojde ke ztrátě řady důležitých látek nebo také membránového potenciálu. Naopak má velmi malou nebo žádnou působnost vůči gramnegativním bakteriím. Vykazuje hydrofobní vlastnosti [15] [16].

2.5 Enzymy

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly, jejichž hlavní funkce spočívá v katalyzování reakcí v živých systémech. Mohou být jednoduché, nebo složené. Jednoduché enzymy obsahují pouze bílkovinnou část. Mezi jednoduché enzymy patří např. hydrolázy. Složené enzymy obsahují bílkovinnou část, tzv. apoenzym, a nebílkovinnou část, která se nazývá kofaktor. Apoenzym a kofaktor se společně nazývá holoenzym.

Enzymy se řadí mezi biokatalyzátory. Musí zajišťovat specifický průběh reakcí a jejich přesné návaznosti a koordinaci. V mnoha směrech předčí umělé katalyzátory. Jsou účinnější, vykazují určitou specifitu k typu katalyzované reakce, pracují za mírných podmínek a jejich aktivita lze poměrně snadno regulovat. Mezi faktory ovlivňující aktivitu enzymu patří koncentrace substrátu, teplota nebo pH [17].

2.5.1 Mechanismus účinku enzymů

Enzymy, jakožto katalyzátory, fungují na principu snížení aktivační energie. Během prvního kroku dojde k vytvoření komplexu enzym substrát (E-S). Tento krok reakce je obvykle velmi rychlý a reverzibilní. Dochází ke katalýze enzymem a substrát se přemění na produkt. V dalším kroku tedy z komplexu enzym substrát vzniká komplex enzym produkt (E-P), který se rozpadne za uvolnění produktu. Tato část reakce je již pomalá a ireverzibilní. Aktivační energie, která je potřebná k vytvoření každého meziprojektu a zároveň k následné přeměně E-S na E-P, je nižší než při přímé přeměně substrátu na produkt [17].

2.5.2 Rozdělení enzymů

Rozeznáváme šest hlavních tříd enzymů podle typu katalyzované reakce (podle reakční specifity).

2.5.2.1 Oxidoreduktasy

Oxidoreduktasy katalyzují oxidačně redukční reakce (tj. dochází k přenosu elektronů, vodíků nebo reakce s kyslíkem). Řadíme mezi ně např. alkoholdehydrogenasu (ADH), která katalyzuje přeměnu ethanolu na acetaldehyd; nebo laktátdehydrogenasu (LDH), která katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát [17].

2.5.2.2 *Transferasy*

Jsou to enzymy, které realizují přenos celých skupin atomů z donoru na akceptor. Mezi transferasy patří např. fosfotransferasy, které přenášejí fosfátovou skupinu z ATP nebo jiných donorů, nebo aminotransferasy, které přenášejí amino skupinu [17].

2.5.2.3 *Hydrolasy*

Katalyzují hydrolytické štěpení vazeb, které vznikly kondenzací. Jedná se o nejběžnější typ vazeb, který se vyskytuje v živých systémech (např. peptidové vazby v bílkovinách). Do této skupiny enzymů řadíme například proteasy, které štěpí peptidové vazby, nebo lipasy štěpící vazby esterové [17].

2.5.2.4 *Lyasy (synthasy)*

Katalyzují nehydrolytické štěpení a vznik vazeb, pokud není vyžadováno dodání energie. Většinou využijí mechanismu, kdy odštěpí malou molekulu (H_2O , CO_2 , NH_3 apod.) ze substrátu. U syntéz malou molekulu vnesou do substrátu. Patří sem dekarboxylasy – např. pyruvátdekarboxylasa, která katalyzuje odštěpení CO_2 z molekuly pyruvátu za vzniku acetaldehydu [17].

2.5.2.5 *Isomerasy*

Katalyzují izomerační reakce, umožňují vnitromolekulové přesuny atomů a jejich skupin, vzájemné přeměny isomerů. Příklad isomerasy je triosafosfatisomerasa, která katalyzuje přeměnu D-glyceraldehyd-3-fosfátu na dihydroxyacetonfosfát [17].

2.5.2.6 *Ligasy (synthetasy)*

Katalyzují vznik vazeb za současného rozštěpení makroergické fosfátové vazby (např. v ATP). Důležitá skupina, která patří do ligas jsou karboxylasy. Příkladem může být pyruvátkarboxylasa, která katalyzuje přenos CO_2 do molekuly pyruvátu za vzniku oxalacetátu [18].

2.5.3 *Lysozym*

Lysozym se řadí k enzymům třídy hydrolas a je složen ze 129 AMK. Katalyzuje hydrolýzu 1,4- β -glykosidické vazby mezi N-acetylmurámovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem, které jsou obsaženy v peptidoglykanu, což je hlavní složka buněčné stěny grampozitivních bakterií. Tato hydrolýza způsobí lýzi bakterie.

Díky svým antimikrobiálním účinkům je v potravinářství využíván jako konzervant, například těstovin, sushi, masa... Používá se ale také při výrobě sýrů, je obsažen ve víně či ovocných džusech. Přirozeně se vyskytuje v mateřském mléce, ve slinách, slzách, krevní plazmě, vaječném bílku apod. Získává se z vaječných bílků nebo pomocí genové technologie z bakterií [19].

2.6 *Bakteriální buňka*

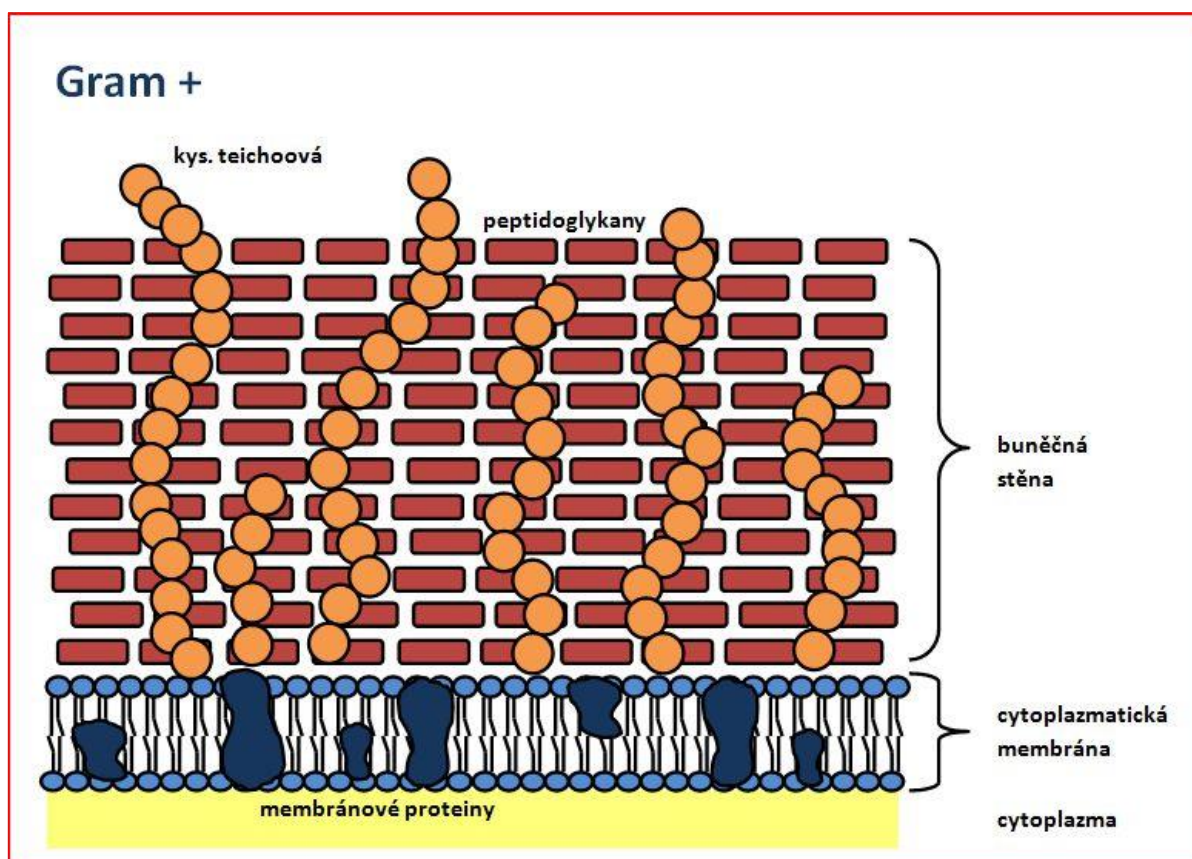
Bakterie jsou prokaryotické buňky, rozměrově dosahují desetin až několika desítek mikrometrů. Mají mnohem jednodušší vnitřní strukturu než buňky eukaryotické. Obsahují jádro, ribosomy, cytoplasmu, cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu [20] [21].

2.6.1 Buněčná stěna bakteriální buňky

Jedná se o jediný pevný buněčný útvar v bakteriální buňce. Uděluje buňce tvar a chrání ji mechanicky i chemicky (např. proti vysoušení, proti záření, ...). Buněčná stěna lze rozlišit na dva typy bakteriální buněčné stěny: buněčnou stěnu grampozitivních bakterií a buněčnou stěnu gramnegativních bakterií [21].

2.6.1.1 Buněčná stěna grampozitivních bakterií

Buněčná stěna těchto bakterií je asi 20 nm tlustá a je tvořena převážně silnou vrstvou peptidoglykanu (viz Obrázek 1). Skrz tuto vrstvu pronikají na povrch lineární řetězce teichoové kyseliny. Jsou to ve vodě rozpustné lineární polymery glycerolfosfátu nebo ribitolfosfátu s glykosidicky navázanými cukry. Jejich funkce není s jistotou známa, pravděpodobně vážou kationty, které jsou důležité pro integritu stěny i membrány. Buněčná stěna grampozitivních bakterií neobsahuje bílkoviny, ani lipidy [20] [22].

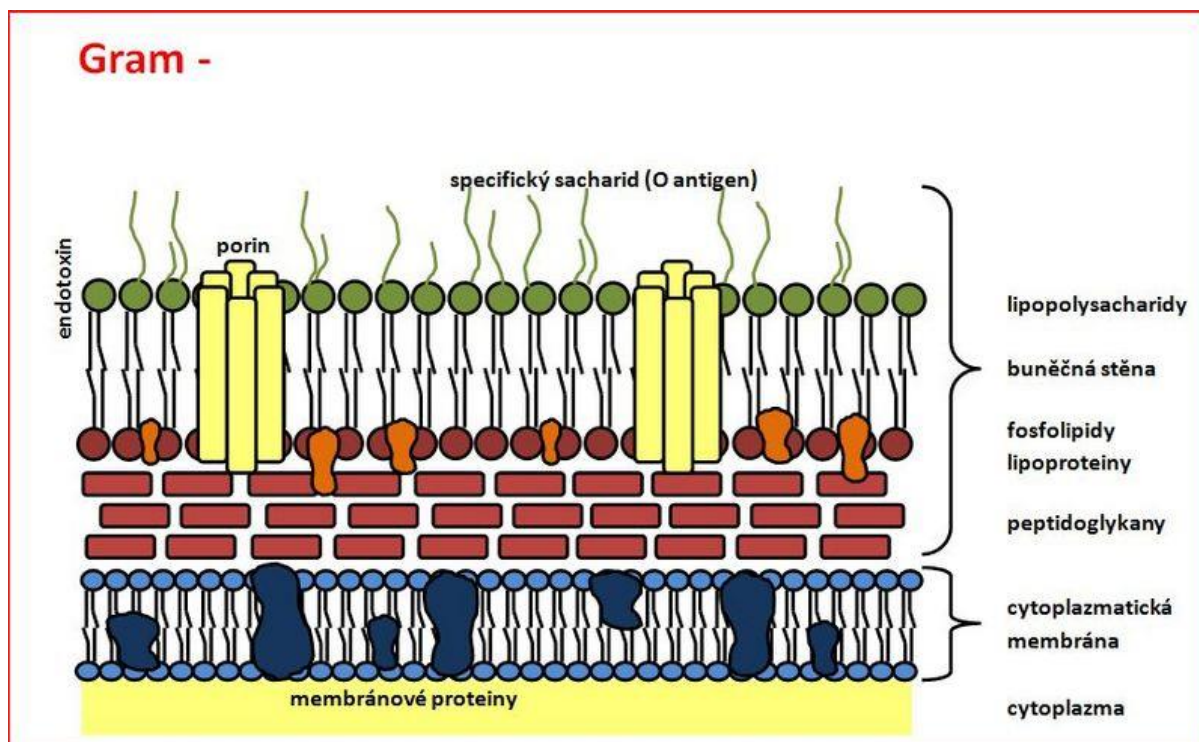


Obrázek 1: Stavba buněčné stěny grampozitivní bakterie [23]

2.6.1.2 Buněčná stěna gramnegativních bakterií

U gramnegativních bakterií je buněčná stěna značně odlišná (viz Obrázek 2). Je tenčí, dosahuje asi 10 nm, ale na rozdíl od buněčné stěny grampozitivních bakterií je složitější. Obsahuje tenkou vrstvu peptidoglykanu, nad kterou se nachází membrána tvořená fosfolipidovou dvojvrstvou a v ní jsou vázané bílkoviny. V zevní vrstvě se nachází lipopolysacharidy. Tato membrána se nazývá vnější membrána. Buňce poskytuje protichemickou ochranu, přísun živin a současně chrání buňku před lytickými účinky enzymů,

žlučových kyselin, lysozymu, penicilinu atd. Činí buňku mechanicky křehčí, avšak chemicky odolnější, než je buňka grampozitivní [20] [22].



Obrázek 2: Stavba buněčné stěny gramnegativní bakterie [23]

2.7 Použité bakteriální kultury

2.7.1 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae* a rodu *Serratia*. Jedná se o gramnegativní bakterie, které dosahují rozměru 0,9-2,0 x 0,5-0,8 μm. Tvarem připomínají rovné tyčinky, pohybující se pomocí bičků. Jsou fakultativně anaerobní a vyživují se chemoorganotrofně. Jejich optimální kultivační teplota je 37 °C a nemají žádné speciální požadavky na výživu a růst. Vyskytují se ve vodě, v půdě a najdeme je i na rostlinném povrchu. Pro člověka je tento mikroorganismus potenciálním patogenem [24] [25].

2.7.2 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus patří do čeledi *Micrococcaceae* a rodu *Micrococcus*. Jsou to aerobní grampozitivní bakterie o rozměrech 0,9-1,8 μm. Jedná se o nepohyblivé kulovité buňky, vyskytující se v tetrádách. Způsob výživy bakterie je chemoorganotrofní. Primárně se mikroorganismus vyskytuje na pokožce savců, sekundárně se vyskytuje v mase, půdě nebo ve vodě. Optimální kultivační teplota se pohybuje mezi 25-37 °C. Na kultivačních médiích tvoří žlutobílé kolonie. V přítomnosti nízkých koncentrací soli je růst podpořen, avšak při 15% koncentraci NaCl je růst již inhibován [26].

2.7.3 *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes se řadí do čeledi *Propionibacteriaceae* a do rodu *Propionibacterium*. Je to anaerobní (aerotolerantní) grampozitivní bakterie, která je spojena

s výskytem akné. Je schopná produkovat enzymy, které poškozují kůži a bílkoviny. Tato bakterie je typickým představitelem komensalismu (jeden organismus má ve vztahu prospěch, zatímco druhý organismus není nijak ovlivněn). Přirozeně se vyskytuje na lidské kůži, kde není patogenní, jakmile ale kontaminuje krev či jinou lidskou tekutinu, je schopná způsobit řadu infekcí včetně již zmíněného akné. Živí se mastnými kyselinami z kožního mazu v mazových žlázách. Svoje jméno získala díky schopnosti produkce kyseliny propionové [27].

2.8 Enkapsulace

Enkapsulaci můžeme definovat jako proces zachycení látky (aktivní látky) pomocí jiné látky, která bude tvořit obalovou vrstvu neboli stěnu částice. Enkapsulovaná látka může být nazývána jako jádro, vnitřní nebo účinná fáze, či náplň. Látka, která tvoří stěnu, bývá nazývána jako membrána, povlak, kapsule, skořápka, matrice nebo vnější fáze.

V potravinářském průmyslu existuje mnoho důvodů, proč enkapsulaci využít. Je to velmi užitečný způsob, jak zlepšit stabilitu aktivních látek v potravinách a řídit dopravu bioaktivních molekul (např. antioxidantů, minerálů, vitamínů nebo mastných kyselin) a živých buněk (např. probiotik) do cílového místa v lidském těle.

Enkapsulovat je možné pevné látky, kapaliny i plyny do malých kapsulí, které uvolní svůj obsah po určitém čase a za specifických podmínek. Z tohoto důvodu se využívá enkapsulace zejména ve farmaceutickém odvětví, a to především pro transport léčiv s řízeným uvolňováním. Připravené částice mají zpravidla velikosti od několika nm do několika mm.

Procesem enkapsulace lze vytvořit bariéru mezi citlivými bioaktivními materiály a životním prostředím (tedy mezi vnitřním a vnějším okolím). Enkapsulace tedy umožňuje změnit chuť a vůni produktu – maskovat zápach a nežádoucí chuť, stabilizovat složky potravin nebo zvyšovat jejich biologickou dostupnost. Enkapsulace tak může být aplikována k modifikaci fyzikálních vlastností původního materiálu s cílem: snadnější manipulace; separovat jednotlivé komponenty směsi, které by mohly spolu reagovat; zajistit adekvátní koncentraci a jednotné rozprostření aktivní látky v potravine atd. [28].

2.8.1 Materiály pro enkapsulaci

Mezi nejdůležitější kritéria výběru správného materiálu k enkapsulaci je funkcionalita, kterou materiál poskytne finálnímu produktu, způsob uvolňování, stabilita, v neposlední řadě i cena apod. Materiál musí být zároveň biokompatibilní a být schopen tvořit ochrannou bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím. Obalový materiál by se měl vůči aktivní látce chovat inertně, nereagovat s ní. Jako obalové materiály se běžně využívají polysacharidy, lipidy, proteiny, jako je například alginát, chitosan, škrob nebo lecitin [28] [29].

2.8.2 Liposomy

Jsou to částice, které vznikají agregací amfifilních molekul. Nejčastěji se jedná o fosfolipidy (patří sem ale i povrchově aktivní látky, detergenty, cholesterol a další). Podobně jako u buněčných membrán, je základní stavební strukturou fosfolipidová dvojvrstva. Fosfolipidy obsahují hydrofilní (polární) část, často nazývána hydrofilní hlavičkou a hydrofobní (nepolární) část, která je tvořena mastnými kyselinami. Tato část je nazývána hydrofobní ocas. V důsledku přítomnosti hydrofilní i hydrofobní části se ve vodném prostředí tyto amfifilní molekuly organizují do složitějších struktur.

Liposomy lze dělit podle několika kritérií. Mohou se dělit podle lamalality, náboje, velikosti i podle přítomnosti určitých funkčních skupin. Pokud je suspenze pouze z čistého lecitinu ve vodě, dojde ke vzniku vícevrstevné struktury a jednotlivé lipidové dvojvrstvy jsou odděleny vodnou fází. Podle velikosti rozlišujeme malé (20–100 nm), velké (100–1000 nm) a obrovské částice (větší než 1000 nm).

Pokud je suspenze tvořena částicemi, které se mohou enkapsulovat, závisí pak na jejich charakteru, kam se do liposomu začlení. Hydrofobní molekuly se začlení do struktury fosfolipidové dvojvrstvy, zatímco hydrofilní molekuly se začlení do vodné výplně liposomu. Liposomy se často připravují ze směsi cholesterolu a fosfolipidů, díky čemuž je řízena jejich propustnost a pevnost [30] [31].

2.8.3 Charakterizace liposomů

2.8.3.1 Charakterizace velikosti liposomů pomocí dynamického rozptylu světla (DLS)

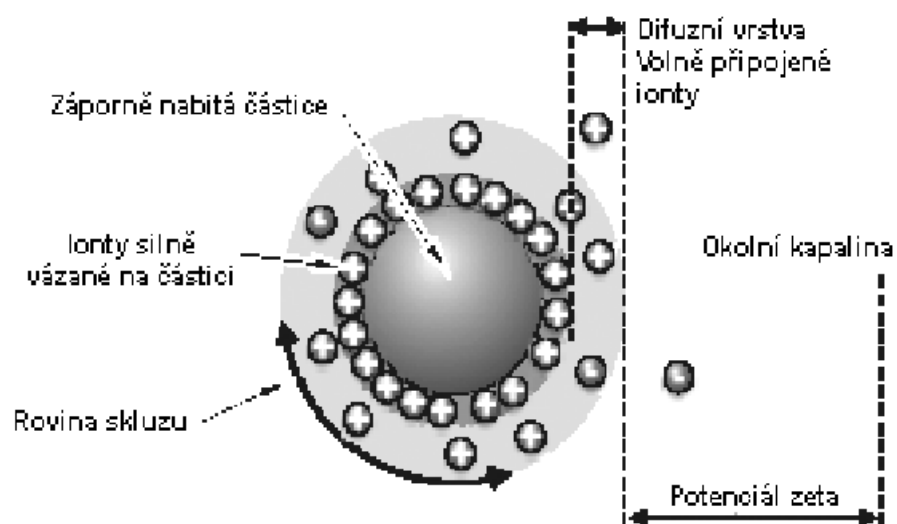
Princip stanovení velikosti částic spočívá ve sledování rychlosti Brownova pohybu částic nebo molekul ve vzorku. Brownův pohyb je definován jako náhodný pohyb částic v kapalině (pozorován je rovněž i v plynech) způsobený jejich bombardováním molekulami, které je obklopují. Pohyb částic v kapalině je náhodný a rychlost tohoto pohybu se používá pro stanovení velikosti částic.

Pohyb částic probíhá neustále. Je zřejmé, že velké částice se pohybují pomalu a malé částice se pohybují v kapalině rychle. K výpočtu rychlosti je třeba vědět, o kolik se částice za daný čas přesunula [32].

2.8.3.2 Stanovení stability liposomů pomocí zeta potenciálu

Ke stanovení stability částic se využívá elektroforetického rozptylu světla. Kapalina obvykle obsahuje ionty a když se v kapalině nachází nabitá částice, budou k jejímu povrchu přitahovány opačně nabití ionty. Metoda elektroforetického rozptylu světla měří, jak rychle se v kapalině pohybuje částice, poté co se aplikuje elektrické pole. Je to destruktivní metoda. Pokud je známa rychlost částice a velikost aplikovaného elektrického pole, je možné s použitím dvou dalších konstant vzorku – viskozity a dielektrické konstanty – vypočítat potenciál zeta.

U povrchu částice se ionty vážou silně, naopak ionty, které jsou dále, se tak pevně nedrží a jsou volné. Tyto volné ionty vytváří tzv. difuzní vrstvu. Uvnitř této vrstvy existuje pomyslná hranice – rovina skluzu. Když se do vzorku vloží napětí, budou se ionty uvnitř této hranice pohybovat s částicí a oproti tomu ionty vně hranice zůstanou nehybné. Potenciál, nacházející se na rovině skluzu, se nazývá zeta potenciál (Obrázek 3). Aby byl systém dostatečně stabilní, musí mít dostatečně kladný nebo záporný zeta potenciál. Částice s velkým nábojem se k sobě nemohou přibližovat a nemůže dojít k agregaci. Dostatečně záporným nebo kladným zeta potenciálem se rozumí rozmezí mV (∞ , +30) a (-30 , ∞) [33] [34].



Obrázek 3: Zeta potenciál nabité částice v kapalině [33]

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je izolace a charakterizace fenolických látek medu a testování možnosti jejich aplikace v kosmetických přípravcích s antimikrobiálním účinkem. V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Příprava a charakterizace extraktů z vybraných druhů medu
- 2) Testování antioxidačního a antimikrobiálního účinku připravených extraktů ve volné a enkapsulované formě
- 3) Testování možnosti zvýšení antimikrobiálního účinku přidavkem další antimikrobiální složky (Nisin, Lysozym)
- 4) Návrh a testování kosmetického výrobku s obsahem aktivních látek z medu

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

ABTS – (2,2–azinobis(3–ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)), Sigma-Aldrich (DE)
Brain Heart Infusion Agar, Himedia (India)
Diethylether, Penta (ČR)
Dusičnan sodný, Lach-Ner (ČR)
Ethanol, Penta (ČR)
Ethylacetát, Penta (ČR)
Folin-Cicolteau činidlo, Penta (ČR)
Glukosa, Lach-Ner (ČR)
Glycerol, Penta (ČR)
Heptahydrát hydrogenarseničnanu sodného, Lach-Ner (ČR)
Hexan, Penta (ČR)
Hydrogenuhlíčitan sodný, Lach-Ner (ČR)
Hydroxid sodný, Lach-Ner (ČR)
Chlorid hlinitý, Lach-Ner (ČR)
Chloroform, Penta (ČR)
Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu, Sigma-Aldrich (DE)
Katechin, Sigma-Aldrich (DE)
Kyselina sírová, Lach-Ner (ČR)
Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DE)
L- α -Phosphatidylcholine – lecithin ze sóje, Sigma-Aldrich (DE)
Lysozym, Sigma-Aldrich (DE)
Molybdenan amonný, Lach-Ner (ČR)
Nisin z *Lactococcus lactis*, Sigma-Aldrich (DE)
Nutrient Broth, Himedia (India)
Pentahydrát síranu měďnatého, Lach-Ner (ČR)
Síran sodný, Lach-Ner (ČR)
Trolox, Sigma-Aldrich (DE)
Uhličitán sodný, Lach-Ner (ČR)
Vínan sodno-draselný, Lach-Ner (ČR)

4.2 Chemikálie a přístroje použité pro práci s buňkami

Antibiotic-Antimycotic 100X (Biosera), Biotech (DE)
Dodecylsíran sodný, Serva (DE)
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich (DE)
Inverzní biologický mikroskop i-101 LW Scientific, Laboserv (ČR)
MTT, Duchefa Biochemie (NLD)
Trypsin Versene EDTA, P-Lab (ČR)

4.3 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (DE)
Automatické pipety v různém rozsahu objemu, Discovery (DE) a Biohit (DE)

Centrifuga EPP Minispin plus, eppendorf (ČR)
ELISA Reader BioTek ELx808, BioTek (DE)
Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS, Malvern (UK)
Míchačka IKA RW 11 basic, IKA (DE)
Předvážky, O'Haus (DE)
Vakuová rotační odparka, KIKA®-WERKE (DE)
Spektrofotometr – Helios δ , Unicam (UK)
Sterilní box – Biohazard box, model Airstream, třída II -ESCO, Biotech (DE)
Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)
Ultrazvukový homogenizátor – Bandelin Sonoplus HS3200, Sonorex Technik (DE)
Vortex V-1 Plus, Biosan Ltd. (LV)

4.4 Vybrané medy

Domácí med (země původu: Ukrajina)

Med lipový, Medokomerc (země původu: ČR, Bulharsko, Rumunsko, Srbsko, Moldavská republika)

Med luční, Medokomerc (země původu: ČR, Uruguay, Chile, Ukrajina, Moldavská republika, Argentina)

4.5 Použité mikroorganismy

K testování antimikrobiální aktivity byly použity kultury *Micrococcus luteus* (CCM 1569), *Propionibacterium Acnes* (CCM 3343) a *Serratia Marcescens* (CCM 8587). Bakteriální kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.6 Příprava extraktů

4.6.1 Extrakce kapaliny do kapaliny

Extrakty byly připraveny metodou extrakce z kapaliny do kapaliny za použití organických rozpouštědel. V rámci optimalizace extrakce (kapitola 4.6.3) byly vyzkoušeny různé navážky medu a několik organických rozpouštědel o různých objemech. Mezi rozpouštědla, která byla vyzkoušena, patří: chloroform, diethylether, ethylacetát a hexan.

Dané množství vzorku medu bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Po rozpuštění medu byl roztok kvantitativně převeden do dělicí nálevky společně s určitým objemem daného rozpouštědla (viz Tabulka 1). Obsah dělicí nálevky se ručně vytřepával po dobu 1 minuty. Při vytřepávání bylo nutné pootočením kohoutu občasné uvolňování vzduchu vytvořeného zvyšujícím se vnitřním tlakem. Po 1 minutě se nechala ustavit rovnováha mezi fázemi a následně se spodní vodná fáze odpustila a horní organická fáze se jímala do čisté kádinky (při použití chloroformu byla naopak organická část naspodu dělicí nálevky a nahoře část vodná). Vodná fáze se kvantitativně převedla zpět do dělicí nálevky a opět se přidal daný objem rozpouštědla. Dále se postupovalo stejným způsobem. Celkem se vytřepávání provádělo s každým vzorkem třikrát.

Odebíraná organická část se následně ještě přefiltrovala přes bezvodý síran sodný, který absorboval poslední části vodné fáze. Takto vyextrahované vzorky se poté nechaly na rotační

vakuové odparce zcela odpařit. Odparek se zpětně rozpustil v ethanolu (v rámci optimalizace byl použit ethanol o různé koncentraci).

4.6.2 Příprava vodného a ethanolového extraktu

Do malé kádinky byl navážen 1 g vzorku medu. Med byl skleněnou tyčinkou rozmíchán a rozpuštěn v 10 ml destilované vody nebo v 10 ml 30% ethanolu.

4.6.3 Optimalizace extrakce

Optimalizace extrakce byla provedena na vzorku domácího medu. Organická rozpouštědla (chloroform, diethylether, ethylacetát, hexan) byla použita v různých objemových poměrech na odlišné navážky medu. Také výsledný odparek byl vyzkoušen rozpustit v chloroformu nebo ethanolu o různé koncentraci. Následující tabulka (Tabulka 1) shrnuje typy vytvořených extraktů, navážky medu, použitá rozpouštědla, použitý objem na vytřepávání a použité rozpouštědlo odparku.

Tabulka 1: Optimalizace extrakce

	navážka medu	typ extraktu	objem rozpouštědla	
1. série	1 g	vodný	10 ml	
		30% ethanolový	10 ml	
	navážka medu	organické rozpouštědlo	objem na vytřepávání	rozpouštědlo odparku
2.série	3 g	Diethylether	1x30 ml + 2x10 ml	80% ethanol
		Ethylacetát	1x30 ml + 2x10 ml	80% ethanol
		Chloroform	1x30 ml + 2x10 ml	80% ethanol
3.série	5 g	Diethylether	3x30 ml	chloroform
		Ethylacetát	3x30 ml	chloroform
4. série	5 g	Diethylether	3x40 ml	50% ethanol
		Ethylacetát	3x40 ml	50% ethanol
	5 g	Diethylether	3x50 ml	50% ethanol
		Ethylacetát	3x50 ml	50% ethanol
5. série	5g	Hexan	3x40 ml	50% ethanol

4.7 Charakterizace extraktů

4.7.1 Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona

Do zkumavky k 1 ml vzorku extraktu bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II. Vzorek byl následně umístěn do vroucí lázně na 10 minut a poté ochlazen na laboratorní teplotu tekoucí vodou. Do vzorku ochlazeného na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,5 ml

Somogyi-Nelsonova činidla III. Vzniklý Cu_2O byl poté důkladně rozpuštěn promícháním na vortexu. Nakonec byl objem doplněn na 10 ml a byla změřena absorbance při vlnové délce 720 nm oproti blanku, kde namísto vzorku byla přidána destilovaná voda.

Celková koncentrace sacharidů byla vypočtena dle rovnice kalibrační přímky pro glukosu v koncentračním rozmezí 0,002-0,01 mg/ml

4.7.1.1 Příprava roztoků

- Somogyi-Nelsonovo činidlo I: 12 g uhličitanu sodného, 8 g hydrogenuhličitanu sodného a 6 g vlnanu sodno-draselného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. 72 g síranu sodného bylo rozpuštěno v 300 ml destilované vody. Oba roztoky byly smíchány.
- Somogyi-Nelsonovo činidlo II: 4 g pentahydrátu síranu měďnatého bylo smícháno s 24 g síranu sodného a rozpuštěno v 200 ml destilované vody.
- Somogyi-Nelsonovo činidlo III: 25 g molybdenanu amonného bylo rozpuštěno ve 450 ml destilované vody. Do roztoku bylo přidáno 21 ml koncentrované kyseliny sírové. 3 g heptahydrátu hydrogenarseničnanu sodného byly rozpuštěny v 25 ml destilované vody a oba roztoky byly smíchány. Připravený roztok byl ponechán po dobu 48 hodin ve tmě při laboratorní teplotě.

4.7.2 Stanovení polyfenolických látek

Do zkumavek bylo napipetováno 1 ml 10x ředěného Follin-Ciocaltauova činidla, 1 ml vody a 50 μl vzorku extraktu. Roztok byl promíchán na vortexu a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Pak byl do zkumavek přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Roztok byl opět promíchán a ponechán 15 minut stát při laboratorní teplotě.

Po 15 minutách byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 750 nm oproti blanku, kde namísto vzorku byla přidána voda.

Celková koncentrace polyfenolických látek byla vypočtena dle rovnice kalibrační přímky pro kyselinu gallovou v rozmezí koncentrací 0,1–0,7 mg/ml.

4.7.3 Stanovení antioxidační aktivity

Roztok ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 7 mmol/l. Reakcí s 2,45 mmol/l peroxodisíranu draselného byl získán radikálový aniont $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Takto připravený roztok byl ponechán nejméně 12 hodin ve tmě.

Před měřením byl roztok ABTS zředěn ethanolem na hodnotu absorbance přibližně 0,700. Měření bylo prováděno při vlnové délce 734 nm oproti ethanolu. K měření byla použita zúžená kyveta, do které byl napipetován 1 ml připraveného $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a 10 μl vzorku. Poté byl zaznamenán pokles absorbance po 10 minutách. Jako blank byl použit 1 ml $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a 10 μl destilované vody.

Celková antioxidační aktivita byla vypočtena podle rovnice kalibrační přímky pro trolox (rozpuštěn v 60% ethanolu) v rozmezí koncentrací 40–400 $\mu\text{g/ml}$.

4.7.4 Stanovení flavonoidů

Do každé zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml vody a 0,2 ml 5% roztoku NaNO_2 . Roztok byl poté promíchán na vortexu a ponechán 5 minut stát při laboratorní

teplotě. Po pěti minutách se k roztoku přidalo 0,2 ml 10% AlCl_3 . Roztok byl opět promíchán na vortexu a ponechán při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následně se k roztoku přidalo 1,5 ml 5% NaOH a 1 ml vody. Roztok byl nechán 15 minut stát při laboratorní teplotě. Po uplynutí času byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm oproti blanku, jímž byla destilovaná voda.

Celková koncentrace flavonoidů byla vypočtena podle rovnice kalibrační přímky pro katechin, která byla sestrojena v rozmezí koncentrací 0,05–0,3 mg/ml.

4.8 Příprava liposomů

Na analytických vahách bylo do malé kádinky naváženo 10 mg cholesterolu a 90 mg lecithinu. K této navážce bylo přidáno 9 ml destilované vody a 1 ml připraveného extraktu. Připravená směs byla ultrazvukována tyčovým ultrazvukem při účinnosti 95 % po dobu přesně 1 minuty. Směs byla současně chlazena ve vodní lázni a její stav kontrolován po každých 20 sekundách.

4.9 Charakterizace liposomů

4.9.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla určena na základě stanovení polyfenolických látek podle postupu v kapitole 4.7.2. Pro zjištění enkapsulační účinnosti byl stanoven obsah polyfenolických látek před enkapsulací v extraktu a po enkapsulaci. Pro stanovení obsahu polyfenolických látek po enkapsulaci bylo nutné liposomy odstředit na 11 000 ot./min po dobu 1 hodiny. V získaném supernatantu byly stanoveny polyfenolické látky. Podílem těchto dvou hodnot byla stanovena enkapsulační účinnost.

4.9.2 Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity bylo opět nutné liposomy odstředit na 1 hodinu při 11 000 ot./min a usazené liposomy rozsuspendovat v odpovídajícím objemu destilované vody. Postup stanovení antioxidační aktivity je shodný s postupem uvedeném v kapitole 4.7.3.

4.9.3 Stanovení velikosti a stability částic

Liposomy byly odstředěny na 5 minut při 11 000 ot./min. Supernatant byl odlit do nové eppendorfky a znovu odstředován po dobu 1 hodiny při 11 000 ot./min. Usazené liposomy byly rozsuspendovány v odpovídajícím objemu destilované vody a 100x zředěny.

Ve 100x zředěných roztocích byla změřena velikost a stabilita částic. Pro stanovení velikosti částic bylo využito dynamického rozptylu světla na přístroji ZetaSizer. Roztoky byly převedeny do kyvety a byla změřena průměrná velikost a polydisperzita částic.

Stabilita částic byla stanovena pomocí zeta potenciálu. Pro měření byly použity také 100x zředěné roztoky. Do kyvety s 1 ml připraveného roztoku byl vložen elektrodový nástavec. Z hodnot zeta potenciálu byla odvozena stabilita částic.

4.9.4 Sledování dlouhodobé stability

Připravené liposomy byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C. Po dvou měsících byla přeměřena stabilita pomocí zeta potenciálu a případná změna antioxidační aktivity podle kapitoly 4.9.2 a 4.9.3.

4.10 Příprava kosmetických přípravků

4.10.1 Optimalizace přípravy gelů

V rámci optimalizace přípravy gelů byly vytvořeny gely o koncentraci 1 %, 2 % a 4 % a v závislosti na požadovaném stupni zgelovatění byla vybrána správná koncentrace.

4.10.2 Příprava gelů

Čistý gel byl připraven při pokojové teplotě navážením 0,2 g karbomeru do čisté plastové nádoby. Ke karbomeru bylo přidáno 9,8 ml vody. Tato směs byla poté tyčinkou míchána do té doby, než se vytvořila požadovaná gelová struktura.

Bylo připraveno celkem sedm gelů, jejichž složení, kromě 0,2 g karbomeru, popisuje Tabulka 2. Byl vytvořen i gel obsahující čistý nisin a lysozym v koncentraci 2,5 mg/ml.

Tabulka 2: Složení připravených gelů

	Domácí med		Lipový med		Luční med		
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6	
Extrakt	1 g	–	1 g	–	1 g	–	–
Liposomy	–	5 g	–	5 g	–	5 g	–
Voda	8,8 g	4,8 g	8,8 g	4,8 g	8,8 g	4,8 g	7,8 g
Nis/Lys	–	–	–	–	–	–	2 g

4.10.3 Stanovení antioxidační aktivity gelů

Pro stanovení antioxidační aktivity bylo nejprve naváženo 10 mg vzorku gelů připravených dle kapitoly 4.10.2. K tomuto množství pak byl dle postupu v kapitole 4.7.3 přidán 1 ml připraveného ABTS a stanovila se antioxidační aktivita.

4.10.4 Příprava krémů

Bylo připravováno 50 ml krému. Pro úspěšné vytvoření krému bylo nutné nejprve připravit zvlášť vodnou a olejovou fázi. Příprava fází byla prováděna v laboratoři při laboratorní teplotě.

Při přípravě vodné fáze bylo do kádinky odměřeno 42 ml destilované vody a 1,5 ml 86,5% glycerolu (1,3 ml 100% glycerolu a 0,2 ml destilované vody). Takto vytvořená směs byla zahřívána na teplotu 75–80 °C.

K přípravě olejové fáze bylo do čisté kádinky naváženo 1,4 g Ercawax BM1, 1,7 g cetylalkoholu a 0,8 g bílé vazelíny. Poté bylo do kádinky napipetováno 2,2 ml parafinového oleje a 0,825 ml dimethikonu. Vzniklá směs byla taktéž za stálého míchání zahřívána na teplotu 75–80 °C. Ve chvíli, kdy dosáhly obě fáze požadované teploty, byla do vodné fáze za stálého míchání přidávána fáze olejová. Během míchání pak byla směs chlazená s pomocí vodní lázně na laboratorní teplotu.

Krémy, které obsahovaly vytvořené liposomy připravené dle kapitoly 4.8, se v postupu lehce lišily. Příprava olejové fáze byla beze změny, avšak při přípravě vodné fáze bylo do kádinky napipetováno pouze 37 ml destilované vody. Množství glycerolu ve vodné fázi bylo shodné.

Když obě fáze dosáhly požadované teploty, byl rozdíl v tom, že po zahřátí se k vodné fázi přidalo ještě 5 ml liposomů a následně se přidala olejová fáze.

4.10.5 Stanovení antioxidační aktivity krémů

Pro stanovení antioxidační aktivity bylo nutné vzorek krému nejprve připravit dle postupu uvedeného v kapitole 4.10.4. Do eppendorfký bylo naváženo 10 mg vzorku a k tomuto vzorku byl následně přidán 1 ml ethanolu. Poté z takto připraveného vzorku bylo odebráno 10 µl ke stanovení antioxidační aktivity podle postupu v kapitole 4.7.3.

4.11 Analýza obsahu fenolických látek pomocí HPLC

Pro stanovení polyfenolů pomocí HPLC byly použity tři extrakty medu a tři vzorky gelů (vytvořené z analyzovaných extraktů), vždy po jednom od každého z testovaných medů. Extrakty byly vhodně naředěny ethanolem a zfiltrány přes nylonový filtr do vialek. V případě gelů bylo naváženo 10 mg do 1 ml ethanolu, po extrakci polyfenolů (po 24 hodin) byly vzorky také zfiltrány přes nylonový filtr do vialek. Takto upravené vzorky byly následně použity k analýze. Parametry stanovení jsou popsány v následující tabulce (Tabulka 3).

Tabulka 3: Parametry pro stanovení polyfenolů na HPLC

Kolona	Kinetex XB-C18 100A 100 mm x 3 mm, 2.6 µm
Teplota	35 °C
Gradientová eluce	Rozpouštědlo A 1% k. octová, rozpouštědlo B acetonitril, průtok 0,3 ml/min; Změna eluce z 5% na 30% B
Délka analýzy	60 min

4.12 Antimikrobiální testy

Antimikrobiální aktivita byla měřena na třech kmenech bakterií. Na zástupci gramnegativních bakterií – *Serratia marcescens* a na dvou zástupcích grampozitivních bakterií – *Micrococcus luteus* a *Propionibacterium acnes*.

4.12.1 Příprava živného média

Tekuté živné médium pro *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus* bylo vytvořeno smícháním 2,5 g práškového Nutrient Broth se 100 ml destilované vody. Směs byla vždy rozdělena do Erlenmayerových baněk po 50 ml. Médium bylo sterilováno v tlakovém hrnci při teplotě 100 °C 30 minut.

V případě *Propionibacterium acnes* bylo naváženo 3,7 g BHI (Brain Heart Infusion Agar) na 100 ml destilované vody. Připravené Erlenmayerovy baňky byly sterilovány v tlakovém hrnci stejným způsobem.

4.12.2 Kultivace mikroorganismů

Bakterie byly uchovávány v lednici při 4 °C na pevných agarových médiích a před testováním byly vždy ve sterilním boxu zaočkovány do 50 ml připravených Erlenmayerových baněk s tekutým médiem. Takto zaočkováná média se pak nechala na temperované třepačce při 37 °C po dobu 24 hodin kultivovat.

4.12.3 Bujónová diluční metoda

Antimikrobiální účinek nisinu, lysozymu, liposomů s obsahem medových extraktů a kosmetických přípravků byl měřen na základě změny absorbance při 630 nm způsobené růstem, nebo absencí růstu mikroorganismů. Na měření se využívala mikrotitrační destička obsahující 96 jamek. Do jamek bylo vždy napipetováno 50 μ l vzorku a 150 μ l vhodně naředěného média s nakultivovanými buňkami. Jako blank bylo použito 50 μ l vody a opět 150 μ l naředěných buněk. Spektrofotometrické stanovení bylo poté provedeno v čase 0 a v čase 24 hodin.

4.13 Testování cytotoxicity

4.13.1 Kultivace humánních keratinocytů

Imortalizované humánní keratinocyty HaCat byly kultivovány v komerčním DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium. Kultivace buněk probíhala v kultivačních lahvích v inkubátoru při teplotě 37 °C, obsahu CO₂ 5 % a relativní vlhkosti 90 %.

Po vytažení buněk z inkubátoru před prací byly jednotlivé lahvičky zkontrolovány pod mikroskopem. Sledován byl celkový stav buněk, množství, jejich morfologie. Podle množství buněk bylo médium buď vyměněno (každé dva dny), nebo v případě vysokého procenta konfluence byly buňky pasážovány (tzn. po namnožení byly naředěny a přeneseny do kultivačních nádob).

Při pasážování bylo médium vylito a buňky byly propláchnuty fosfátovým pufrům. Po propláchnutí byla přidána proteáza trypsin (0,5 ml do malé lahvičky a do velké 1 ml). Poté byla lahvička na 10 minut vložena do kultivačního boxu. Po této době bylo pod mikroskopem kontrolováno, zda se buňky odloučily ode dna lahvičky. Do centrifugačních zkumavek bylo napipetováno 5 ml fosfátového pufru. Obsahem zkumavek byl několikrát spláchnut celý povrch lahviček. Následně byla suspenze napipetována zpět z lahviček do centrifugačních zkumavek a byla centrifugována 5 minut při 320 g (RCF). Následně byl opatrně slit supernatant tak, aby peletky buněk zůstaly usazené na dně. K buňkám bylo napipetováno médium, v němž byly rozsuspendovány a přeneseny do nové lahvičky, případně více lahviček. V nové lahvičce bylo médium doplněno na požadovaný objem (do malé lahvičky 5 ml, do velké lahvičky 15 ml). Nakonec byly buňky opět zkontrolovány pod mikroskopem a vráceny do inkubátoru.

4.13.2 MTT test cytotoxicity

Metoda je založená na tom, že žluté MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid) je redukováno mitochondriálními enzymy dýchacího řetězce buněk na fialový formazanový derivát. Tento derivát zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných granulí. Po přidání detergentu SDS (dodecylsírán sodný) se barvivo uvolní a rozpustí, a tím vznikne čirý fialový roztok, který se měří spektrofotometricky při 562 nm [35].

Na tento test byly použity buňky po dostatečném nárůstu. První kroky MTT testu byly obdobné pasážování buněk, viz postup v kapitole 4.13.1. Po příslušné centrifugaci a slití supernatantu byl ke každé peletce napipetován 1 ml média, v kterém byly buňky rozsuspendovány. Následně byla spočítána koncentrace buněk pomocí Bürkerovy komůrky.

Buňky byly vhodně zředěny médiem tak, aby jejich výsledná koncentrace byla $2 \cdot 10^4$ buněk/100 μ l. Takto připravená suspenze byla pipetována po 100 μ l na 96 jamkovou destičku. Poté byla destička zkontrolována pod mikroskopem, jestli buňky byly opravdu v každé jamce. Připravená destička byla dána na 24 hodin do inkubátoru. Po této době bylo z jamek odpipetováno médium a bylo místo něj přidáno 100 μ l vzorku do každé jamky v různých koncentracích. Následně byla destička vrácena na 24 hodin do inkubátoru. Po 24 hodinách byl odpipetován vzorek a místo něj bylo do každé jamky napipetováno 20 μ l MTT o koncentraci 2,5 mg/ml v PBS.

Buňky byly takto ponechány 3 hodiny na kultivaci v inkubátoru. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 100 μ l 10% SDS v PBS. Destička byla ponechána ve tmě při laboratorní teplotě na dalších 24 hodin. Po 24 hodinách byla proměřena absorbance při vlnové délce 562 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem této bakalářské práce byla optimalizace extrakce aktivních látek z medu do organického rozpouštědla, následně charakterizace těchto připravených extraktů a liposomů s obsahem zvolených extraktů. V práci byl dále proveden návrh přípravy kosmetických přípravků s obsahem aktivních látek medu v enkapsulované i neenkapsulované formě.

U extraktů byl stanoven obsah sacharidů, celkových polyfenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivita. Po enkapsulaci pak byla u liposomů stanovena enkapsulační účinnost, antioxidační aktivita, velikost a stabilita (včetně dlouhodobé stability a dlouhodobého zachování antioxidační účinnosti). Liposomy, vytvořené z finálních extraktů každého medu, byly také testovány na cytotoxicitu pomocí MTT testu na lidských kožních buňkách.

U finálních kosmetických produktů byla testována antioxidační a antimikrobiální aktivita na třech kmenech bakterií. Kosmetické gely vytvořené z extraktů a odpovídající extrakty byly pro srovnání charakterizovány rovněž pomocí kapalinové chromatografie.

Dále byl testován antimikrobiální účinek nisinu a lysozymu s cílem využít je pro možné zvýšení antimikrobiální aktivity připravených přípravků.

V průběhu práce bylo možné srovnat výsledky třech typů medu, se kterými se pracovalo. Medy, které byly použity, jsou: domácí med a dva vybrané komerčně dostupné medy – tedy lipový a luční.

5.1 Optimalizace extrakce

Optimalizace extrakce probíhala za účelem co největšího možného odstupu sacharidů, který byl ve výsledných extraktech ze začátku přítomen. Hlavním cílem bylo získat extrakt s co nejvyšším obsahem fenolických látek, tedy zajistit co nejlepší izolaci zvolených aktivních látek. Obsahem optimalizace byla volba vhodné navážky medu, správného organického rozpouštědla, objem tohoto rozpouštědla použitý k extrakci a správné rozpouštědlo použité ke zpětnému rozpuštění odparku.

Optimalizace byla prováděna na vzorku domácího medu a probíhala v sériích podle postupu a údajů v kapitole 4.6.3.

Nejprve byly vytvořeny dva typy extraktů – vodný a 30% ethanolový – podle postupu uvedeném v kapitole 4.6.2. Tyto dva typy extraktů byly zavrženy hned zpočátku, jelikož obsahovaly vysoké množství zbývajících cukrů a byly tak nevhodné pro dlouhodobé skladování. Maximální doba skladování těchto extraktů a liposomů s jejich obsahem byla asi 2 až 3 týdny.

Dále byla k extrakci vybrána organická rozpouštědla diethylether a ethylacetát v daném objemu (Tabulka 1) podle postupu uvedeného v kapitole 4.6.1, který byl převzat z diplomové práce [36]. Pro srovnání byla provedena i extrakce pomocí chloroformu. I v této sérii se opakoval problém s vysokým množstvím zbývajících cukrů, a proto byla extrakce dále optimalizována. Chloroform byl vyhodnocen jako nejméně vhodný a i s ohledem na jeho toxicitu byl z další optimalizace vyřazen.

V následujících krocích optimalizace byla společně s objemem použitého rozpouštědla optimalizována i navážka medu. Optimalizováno bylo rovněž rozpouštědlo odparku. Na závěr optimalizace extrakce bylo testováno i využití hexanu. V tomto případě došlo k výbornému

odstupu cukrů, avšak do hexanu se izolovala pouze minimální množství sledovaných aktivních látek. Pravděpodobným důvodem je, že hexan je vhodnější pro izolaci lipofilních látek a vzorek obsahoval větší množství hydrofilnějších látek. Dále se s tímto rozpouštědlem již nepracovalo.

S přihlédnutím k výsledkům stanovení cukrů, enkapsulační účinnosti, antioxidační aktivity a izolaci polyfenolů (viz. následující kapitola), bylo vybráno jako nejvhodnější rozpouštědlo diethylether. K rozpuštění odparku nejlépe vyhovovalo použití 50% ethanolu.

5.2 Charakterizace extraktů

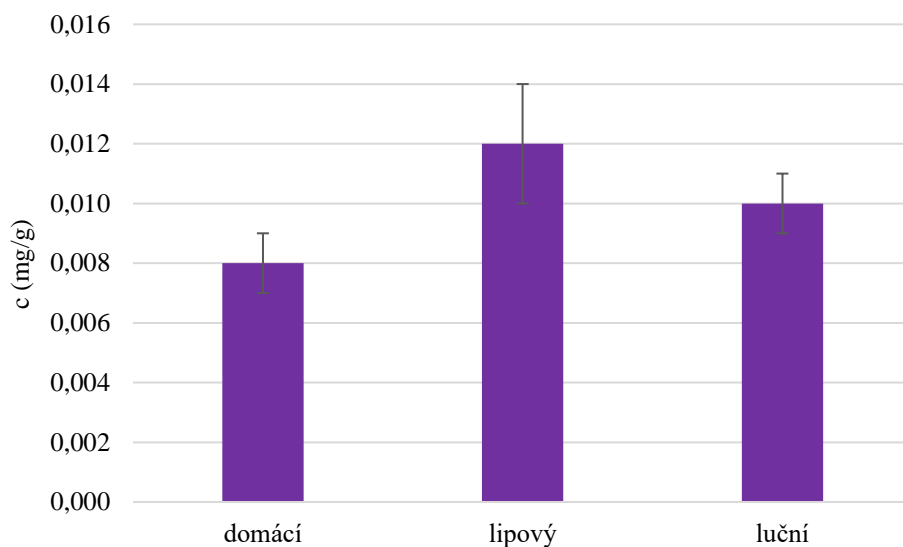
5.2.1 Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona

Stanovení obsahu sacharidů bylo provedeno v rámci optimalizace pomocí pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.7.1. Pro výpočet byla použita stanovená rovnice kalibrační přímky ve tvaru: $y = 19,827x$. Každý vzorek byl proměřen ve třech opakování, průměrná hodnota byla použita k výpočtu koncentrace sacharidů a také byla vypočtena směrodatná odchylka. Výsledky uvedené v mg na g medu shrnuje Tabulka 4.

Tabulka 4: Množství sacharidů v extraktech v rámci optimalizace

	Typ extrakce	c (mg/g)
1. série	vodný	$3,681\ 2 \pm 0,060\ 2$
	30% ethanolový	$3,730\ 5 \pm 0,032\ 0$
2. série	diethylether	$1,943\ 2 \pm 0,041\ 2$
	ethylacetát	$1,510\ 4 \pm 0,110\ 1$
	chloroform	$1,591\ 2 \pm 0,072\ 2$
3. série	diethylether	$0,034\ 0 \pm 0,005\ 1$
	ethylacetát	$0,090\ 8 \pm 0,012\ 0$
4. série	3x40 diethylether	$0,008\ 4 \pm 0,001\ 1$
	3x40 ethylacetát	$0,141\ 5 \pm 0,030\ 0$
	3x50 diethylether	$0,010\ 3 \pm 0,003\ 0$
	3x50 ethylacetát	$0,260\ 5 \pm 0,010\ 0$
5. série	hexan	$0,000\ 4 \pm 0,000\ 2$

Po výběru vhodného rozpouštědla a po jeho využití na extrakci finálních vybraných vzorků medu, tedy medu domácího, lipového a medu lučního, byl stanoven a srovnán obsah cukrů i mezi nimi. Tyto výsledky shrnuje Graf 1. Z grafu je zřejmé, že nejvíce se podařilo snížit množství obsažených cukrů ve vzorku domácího medu a nejvíce jich zůstalo ve vzorku medu lipového.



Graf 1: Srovnání obsahu sacharidů mezi třemi vybranými medy

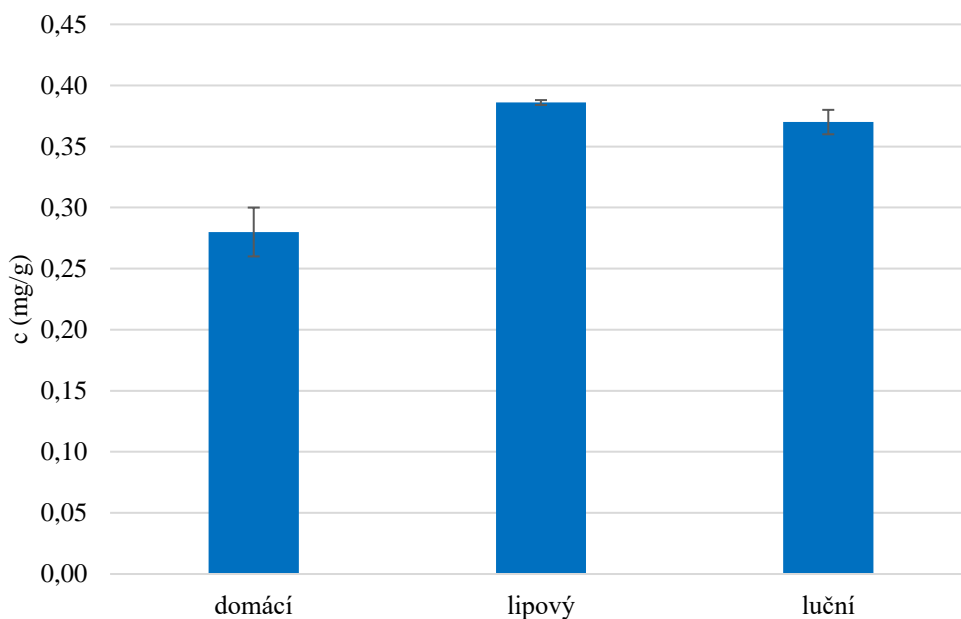
5.2.2 Stanovení polyfenolických látek

Stanovení polyfenolických látek probíhalo podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.7.2. Měření bylo provedeno třikrát pro každý vzorek, z průměru naměřených hodnot se poté stanovila koncentrace celkových polyfenolů v medu. Pro výpočet byla použita stanovená rovnice kalibrační přímky ve tvaru: $y = 0,9093x$. Výsledky uvedené v Tabulce 5, jsou vyjádřeny v mg na g medu.

Tabulka 5: Množství celkových polyfenolů v extraktech v rámci optimalizace

	Typ extrakce	c (mg/g)
1. série	vodný	0,062 1 ± 0,011 2
	30% ethanolový	0,075 3 ± 0,012 3
2. série	diethylether	0,134 3 ± 0,021 5
	ethylacetát	0,093 8 ± 0,013 5
	chloroform	0,122 6 ± 0,033 4
3. série	diethylether	0,110 4 ± 0,011 2
	ethylacetát	0,041 1 ± 0,009 2
4. série	3x40 diethylether	0,284 3 ± 0,022 3
	3x40 ethylacetát	0,091 2 ± 0,014 1
	3x50 diethylether	0,331 0 ± 0,031 3
	3x50 ethylacetát	0,112 2 ± 0,021 0
5. série	hexan	0,009 1 ± 0,000 1

Opět byl následně po optimalizaci extrakce stanoven obsah polyfenolů pro porovnání ve všech vybraných vzorcích medu – domáci, lipový a luční. Tohle srovnání znázorňuje Graf 2. Nejvyšší podíl celkových polyfenolů se podařilo izolovat z medu lipového, nejméně pak z medu domáciho.



Graf 2: Srovnání množství celkových polyfenolů mezi třemi vybranými medy

5.2.3 Stanovení antioxidační aktivity

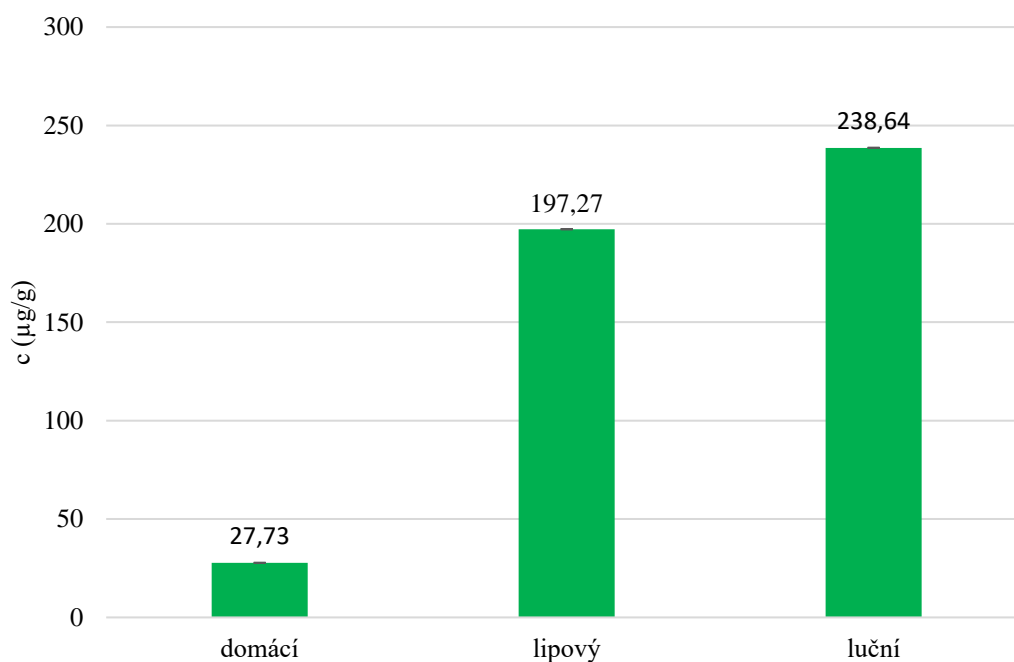
Antioxidační aktivita byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.3. Vzorky byly proměřeny třikrát a ze stanoveného průměru a směrodatné odchylky byla vypočítána antioxidační aktivita. Pro výpočet byla použita stanovená rovnice kalibrační přímky ve tvaru: $y = 0,0011x$.

V rámci optimalizace byla měřena antioxidační aktivita v extraktech domácího medu (viz Tabulka 6). Výsledky jsou uvedené v μg na g medu. Z výsledků je zřejmé, že ve vodném a ethanolovém extraktu nedošlo k výraznému uvolnění aktivních látek a výsledná antioxidační aktivita je zde nejnížší. Je patrné, že extrakty, na jejichž přípravu byl využit diethylether, vykazují poněkud vyšší antioxidační aktivitu než extrakty, které vznikly použitím ethylacetátu.

Tabulka 6: Antioxidační aktivita extraktů v rámci optimalizace

	Typ extrakce	c ($\mu\text{g/g}$)
1. série	vodný	$6,22 \pm 0,03$
	30% ethanolový	$6,83 \pm 0,06$
2.série	diethylether	$7,64 \pm 0,05$
	ethylacetát	$8,34 \pm 0,06$
	chloroform	$8,11 \pm 0,05$
3. série	diethylether	$23,43 \pm 0,02$
	ethylacetát	$12,71 \pm 0,03$
4. série	3x40 diethylether	$27,73 \pm 0,01$
	3x40 ethylacetát	$24,55 \pm 0,01$
	3x50 diethylether	$35,75 \pm 0,03$
	3x50 ethylacetát	$18,18 \pm 0,01$
5. série	hexan	$17,94 \pm 0,02$

Antioxidační aktivita byla následně proměřena u všech třech medů (domácí, lipový a luční). Toto srovnání znázorňuje Graf 3. Z grafu je zřejmé, že extrakt medu lučního a lipového měl několikanásobně vyšší antioxidační aktivitu než med domácí.

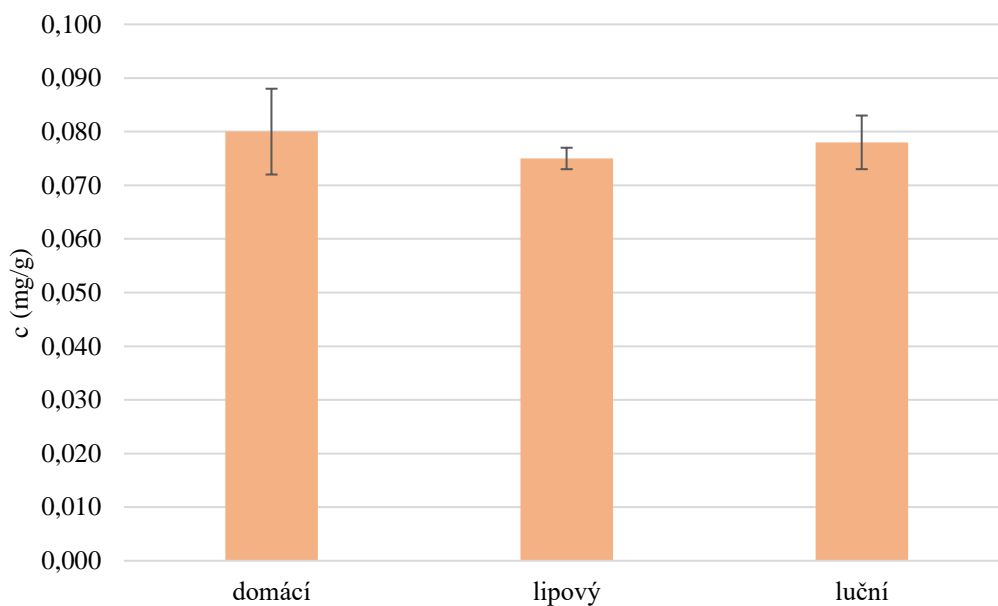


Graf 3: Srovnání antioxidační aktivity u třech zvolených typů medu

5.2.4 Stanovení flavonoidů

Flavonoidy byly stanoveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.4. Vzorky byly proměřeny třikrát a z těchto tří hodnot byl udělán průměr, který byl použit pro výpočet koncentrace flavonoidů. Pro výpočet byla použita stanovená rovnice kalibrační přímky ve tvaru: $y = 3,1147x$.

V tomto případě již nebylo stanovení flavonoidů součástí optimalizace způsobu extrakce, ale pouze jedním z parametrů pro srovnání tří zvolených medů – domácí, lipový a luční. Tyto výsledky porovnává Graf 4, kde jsou koncentrace přepočítány na mg na g medu. Z grafu je zřejmé, že množství flavonoidů se v medech příliš nelišilo, avšak největší množství flavonoidů obsahoval med domácí.



Graf 4: Srovnání množství flavonoidů mezi třemi vybranými medy

5.3 Charakterizace liposomů

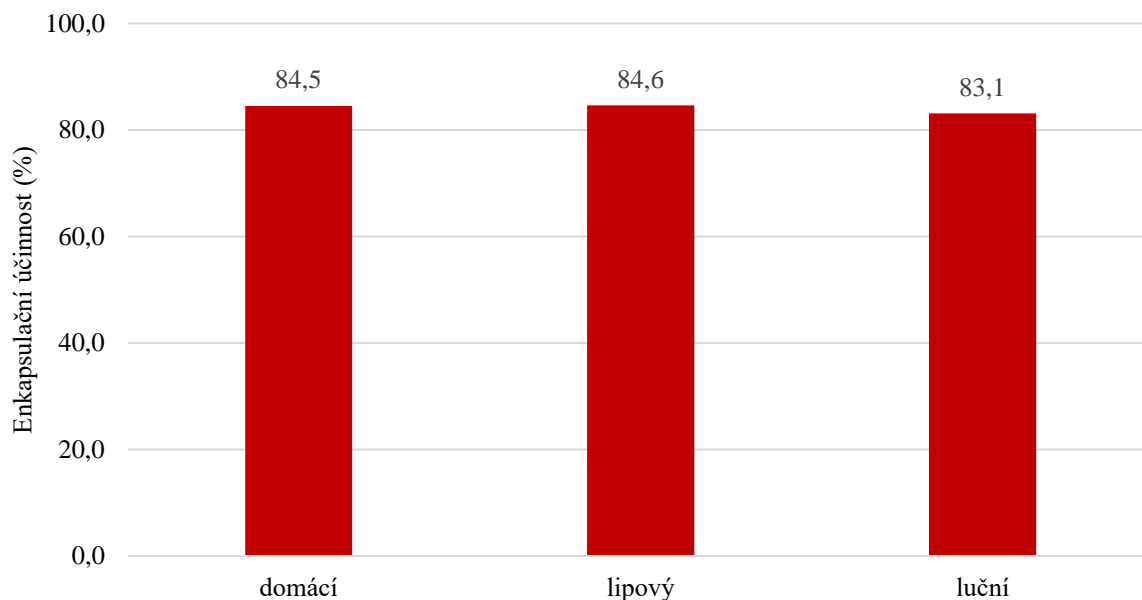
5.3.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla stanovena podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.9.1. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 7. Z dosažených výsledků je patrné, že první série optimalizace, která obsahovala liposomy z medu rozpuštěného pouze ve vodě nebo ethanolu, a pátá série, obsahující liposomy z extraktu do hexanu, měly enkapsulační účinnost nulovou. Dále je viditelné, že v každé sérii diethylether v porovnání s ethylacetátem vykazuje vyšší enkapsulační účinnost.

Tabulka 7: Srovnání enkapsulační účinnosti v rámci optimalizace

	Typ liposomů podle extraktu	%
1. série	vodný	0,0
	30% ethanolový	0,0
2.série	diethylether	63,1
	ethylacetát	52,3
	chloroform	40,2
3. série	diethylether	85,7
	ethylacetát	65,2
4. série	3x40 diethylether	84,5
	3x40 ethylacetát	76,2
	3x50 diethylether	84,2
	3x50 ethylacetát	78,1
5. série	hexan	0,0

Po výsledném výběru extrakce v rámci optimalizace byla srovnána enkapsulační účinnost u vzorků tří testovaných medů – domácí, luční a lipový. Z Grafu 5 je zřejmé, že enkapsulační účinnost se příliš nelišila, ale extrakty se povedlo enkapsulovat až z téměř 85 %. Nejnižší hodnota byla zjištěna pro vzorek medu lučního.



Graf 5: Porovnání enkapsulační účinnosti mezi třemi typy zvolených medů

5.3.2 Stanovení antioxidační aktivity a dlouhodobé antioxidační aktivity

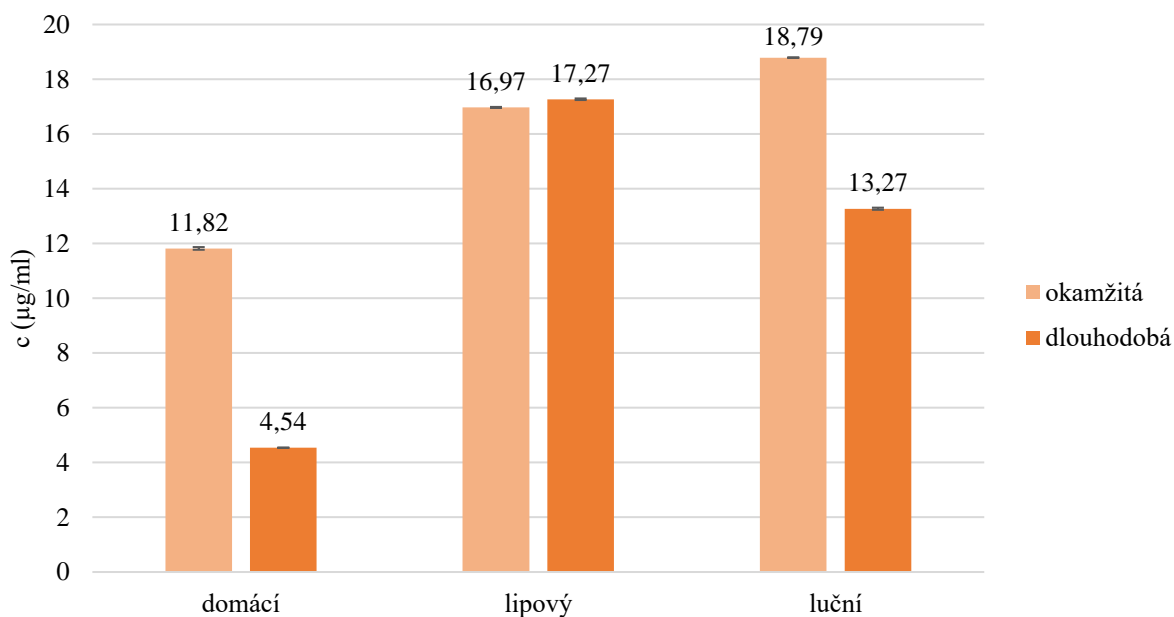
Antioxidační aktivita liposomů byla měřena ihned po jejich vytvoření a poté i dlouhodobě po dvou měsících skladování ve vodném prostředí při 8°C. Postup, podle kterého byla antioxidační aktivita měřena, je uveden v kapitole 4.9.2. Výsledky shrnuje Tabulka 8.

Tabulka 8: Výsledky okamžité a dlouhodobé antioxidační aktivity liposomů

		okamžitá	dlouhodobá
	Typ liposomů podle extraktu	c (μg/ml)	c (μg/ml)
1. série	vodný	1,46 ± 0,01	*
	30% ethanolový	2,61 ± 0,01	*
2. série	diethylether	9,03 ± 0,01	12,36 ± 0,01
	ethylacetát	5,15 ± 0,02	*
	chloroform	4,23 ± 0,02	*
3. série	diethylether	13,18 ± 0,04	19,10 ± 0,03
	ethylacetát	6,67 ± 0,03	7,34 ± 0,01
4. série	3x40 diethylether	11,82 ± 0,05	4,54 ± 0,02
	3x40 ethylacetát	10,05 ± 0,01	4,55 ± 0,03
	3x50 diethylether	8,79 ± 0,03	15,92 ± 0,01
	3x50 ethylacetát	5,45 ± 0,01	3,18 ± 0,01
5. série	hexan	14,55 ± 0,02	22,3 ± 0,03

*U těchto liposomů nebyl po dvou měsících zeta potenciál proměřen, jelikož byly již dříve z důvodu nevyhovující stability vyloučeny.

Okamžitá i dlouhodobá antioxidační aktivita byla proměřena poté i u liposomů vybraných medů. Tuto skutečnost znázorňuje Graf 6. Je zřejmé, že ani po dvou měsících nedocházelo k zásadním změnám liposomů, především u extraktu z lipového medu, kde byla antioxidační aktivita zcela zachována. Naopak významnější pokles antioxidační aktivity byl zaznamenán u medu domácího, kde klesla koncentrace antioxidantů o více než 50 %.



Graf 6: Okamžitá a dlouhodobá antioxidační aktivita liposomů z extraktů vybraných typů medů

5.3.3 Stanovení velikosti a okamžité i dlouhodobé stability částic

Velikost částic a jejich stabilita, kterou vyjadřuje zeta potenciál, byla stanovena podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.9.3. V následující tabulce (Tabulka 9) jsou srovnány naměřené hodnoty pro liposomy vyrobené z extraktů v průběhu optimalizace. Veškeré částice jsou pro kosmetické využití stabilní. Dlouhodobá stabilita byla proměřena po dvou měsících a dá se říci, že částice zůstaly stabilní.

Tabulka 9: Shrnutí výsledků velikosti a stability částic v průběhu optimalizace

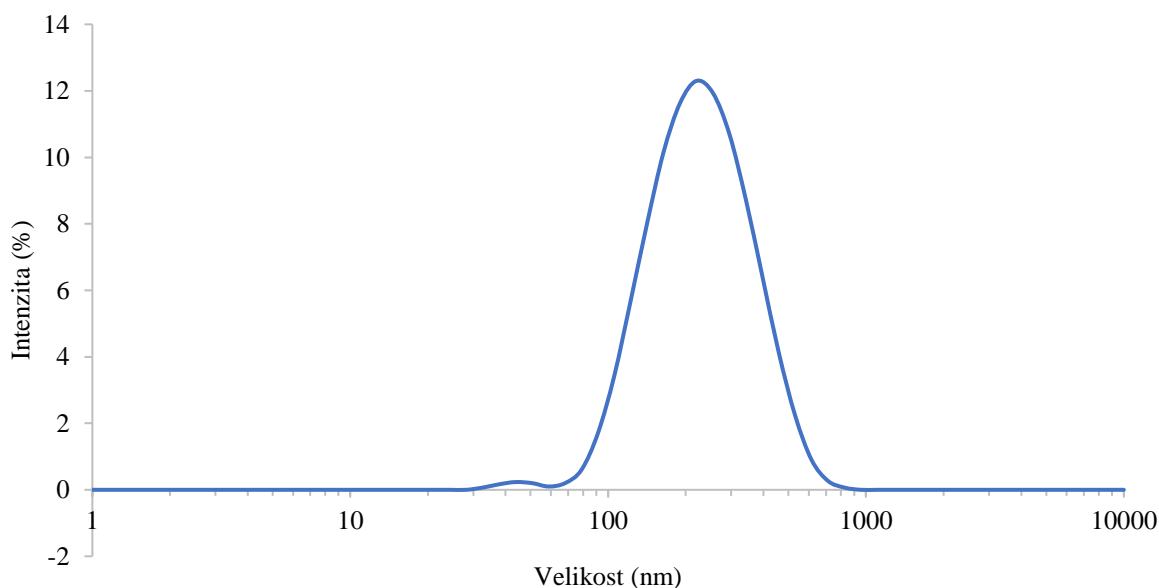
	Typ liposomů podle extraktu	Velikost (nm)	PDI	Zeta (mV) - okamžité	Zeta (mV) - dlouhodobé
1. série	vodný	321,8 ± 6,1	0,24 ± 0,03	-41,2 ± 1,7	*
	30% ethanolový	679,4 ± 16,5	0,67 ± 0,12	-25,7 ± 3,3	*
2. série	diethylether	499,2 ± 14,9	0,48 ± 0,01	-25,4 ± 1,8	-29,1 ± 1,8
	ethylacetát	548,1 ± 2,6	0,11 ± 0,01	-21,6 ± 2,3	*
	chloroform	553,4 ± 4,7	0,24 ± 0,05	-22,5 ± 2,6	*
3. série	diethylether	208,9 ± 4,2	0,17 ± 0,01	-18,8 ± 0,8	-31,2 ± 0,5
	ethylacetát	218,7 ± 6,2	0,16 ± 0,02	-31,3 ± 4,1	-33,4 ± 0,3
4. série	3x40 diethylether	269,7 ± 4,6	0,31 ± 0,03	-32,9 ± 3,5	-29,1 ± 1,6
	3x40 ethylacetát	221,0 ± 4,3	0,28 ± 0,03	-37,2 ± 2,2	-26,8 ± 1,6
	3x50 diethylether	249,9 ± 6,9	0,31 ± 0,03	-36,3 ± 0,2	-28,4 ± 1,3
	3x50 ethylacetát	238,0 ± 0,9	0,27 ± 0,01	-24,4 ± 0,5	-26,6 ± 1,8
5. série	hexan	227,4 ± 5,5	0,30 ± 0,03	-39,5 ± 0,9	-28,1 ± 2,1

*U těchto liposomů nebyl po dvou měsících zeta potenciál změřen, jelikož byly tyto částice již dříve vyloučeny z důvodu nevyhovující stability.

Po výběru vhodného typu extrakce byly vytvořeny liposomy pro tři vybrané medy (domácí, luční a lipový) a opět u nich byla stanovena velikost a stabilita, včetně dlouhodobé (viz Tabulka 10). Největší částice se vytvořily z extraktu domácího medu. Nejméně stabilní částice byly vytvořeny z medu lipového. Graf 7 znázorňuje distribuci velikosti vytvořených částic u medu lipového.

Tabulka 10: Srovnání hodnot velikosti a stability částic pro liposomy tří vybraných typů medů.

Typ medu	Velikost (nm)	PDI	Zeta (mV) - okamžité	Zeta (mV) - dlouhodobé
domácí	269,7 ± 4,6	0,31 ± 0,03	-32,9 ± 3,5	-29,1 ± 1,6
lipový	204,1 ± 4,3	0,21 ± 0,01	-27,4 ± 0,9	-24,9 ± 1,9
luční	233,6 ± 5,4	0,19 ± 0,04	-31,3 ± 1,6	-28,9 ± 2,1

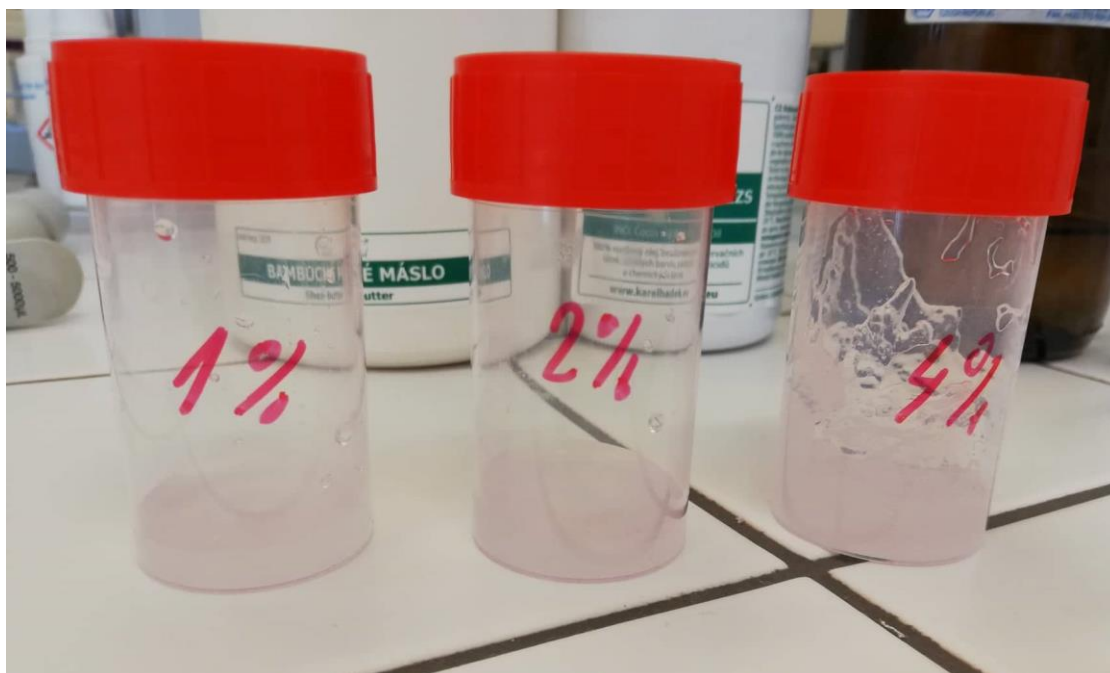


Graf 7: Znázornění distribuce velikosti částic pro lipový med

5.4 Příprava kosmetických přípravků

5.4.1 Optimalizace přípravy gelů

V rámci optimalizace přípravy gelů byly vytvořeny tři různé koncentrace gelu (Obrázek 4) dle postupu uvedeného v kapitole 4.10.1. 1% gel nebyl nejvhodnější, jelikož konzistence tohoto gelu byla velmi řídká, hodila by se spíše na antibakteriální gely na ruce a podobné přípravky. Koncentrace 4% tvořila naopak již poměrně hodně hustý gel, který by se spíše hodil například pro tvorbu čípků apod. Nakonec byla tedy vybrána jako vhodná koncentrace 2% karbomeru. Tento gel by díky své struktuře byl vhodný například pro gelové přípravky na pleť, jelikož se tento gel dobře roztíral a rychle se na místě aplikace vstřebával.



Obrázek 4: Optimalizace přípravy gelu.

5.4.2 Stanovení antioxidační aktivity a množství fenolických látek u krémů a gelů

Antioxidační aktivita připravených kosmetických přípravků (gelů a krémů) byla při spektrofotometrickém stanovení nulová. Příčinou byla pravděpodobně nízká koncentrace aktivních látek v celém objemu gelu. Pro přesnější stanovení byl tedy následně změřen obsah aktivních látek v připravených gelech a použitých extraktech pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), přesný postup stanovení je uveden v kapitole 4.11. Získané hodnoty udává Tabulka 11.

Tabulka 11: Identifikované a stanovené množství fenolických látek pomocí HPLC

	množství fenolických látek					
	μg/ml extraktu			μg/g gelu		
	luční	lipový	domácí	gel luční	gel lipový	gel domácí
kyselina galová	128,2	132,5	56,6	ND	ND	ND
kyselina vanilová	5,6	21,6	20,3	18,1	9,5	1,7
kyselina chlorogenová	14,7	43,0	82,8	ND	ND	ND
kyselina kávová	3,2	5,4	15,6	ND	ND	ND
katechin	22,6	29,5	75,7	ND	ND	ND
epikatechin	0,5	20,6	8,6	ND	ND	ND
kyselina p-kumarová	2,2	4,8	10,9	23,4	32,7	12,1
kyselina ferulová	3,0	25,3	13,7	280,4	207,7	284,2
cinnamaldehyd	19,7	86,7	8,7	44,3	60,7	283,4
rutin	168,0	300,5	100,6	67,5	71,8	64,8
quercetin	59,9	205,6	207,8	931,5	668,8	966,4
myricetin	669,8	821,8	172,1	220,1	169,0	346,2
keamferol	143,1	179,8	220,3	2380,5	2687,5	2990,9
kyselina sinapová	43,5	0,3	26,9	178,7	198,2	176,7
syringaldehyd	1,5	2,4	5,4	14,6	20,4	7,6
vanilin	ND	ND	11,0	ND	ND	ND

Z hlediska obsahu identifikovaných fenolických látek obsahovaly extrakty medu lučního a lipového nejvyšší zastoupení myricetinu, naopak v extraktu z domácího medu byly jako hlavní složky detekovány keamferol a quercetin. U všech připravených gelů pak byl nejvíce zastoupen především keamferol.

5.5 Antimikrobiální testy

Všechny antimikrobiální testy byly provedeny bujónovou diluční metodou, která se vykonávala podle postupu uvedeného v kapitole 4.12.3. Vzorky byly vždy nanášeny do tří jamek a z této trojice byl vždy vypočítán průměr absorbance. Získaná absorbance byla použita pro výpočet účinnosti, která byla vyjádřena v procentech.

5.5.1 Koncentrační řady nisinu a lysozymu

Nejprve byl zjišťován účinek nisinu a lysozymu na zástupci grampozitivních (*Micrococcus Luteus*) a gramnegativních (*Serratia Marcescens*) bakteriích. Byla vytvořena koncentrační řada, která sloužila jako podklad pro výběr správné koncentrace pro testování ještě

ve vytvořeném gelu. Nisin a lysozym byl testován z toho důvodu, že by tyto antimikrobiální látky mohly být přidány k výsledným produktům ke zvýšení jejich antimikrobiálního účinku. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 12. Jedná se o vyjádření inhibice, tedy o kolik procent méně narostla kultura oproti blanku. Z výsledků jasně vyplývá, že nisin i lysozym působí spíše na grampozitivní bakterii. Tím se tedy potvrdily informace o jejich účincích nalezené při zpracovávání literární rešerše.

Tabulka 12: Koncentrační řada nisinu a lysozymu (inhibice)

	<i>S. Marcescens</i>		<i>M. Luteus</i>	
c (mg/ml)	Nisin	Lysozym	Nisin	Lysozym
2,5	+	++	+++	++++
2,0	+	++	++	++++
1,0	+	+	++	+++
0,5	+	+	+	+++

Antimikrobiální aktivita: (+) 0-20 %; (++) 20-50 %; (+++) 50-80 %; (++++) 80-100 %

5.5.2 Antimikrobiální účinek připravených gelů a krémů

Vytvořené kosmetické přípravky byly testovány na antimikrobiální aktivitu opět vůči zástupci grampozitivních (*M. Luteus*) a gramnegativních (*S. Marcescens*) bakterií. Gely byly vytvořeny dle Tabulky 2 uvedené v kapitole 4.10.2. Krémy byly vytvořeny dle postupu v kapitole 4.10.4. Testoval se tedy antimikrobiální účinek gelů obsahujících extrakty ve volné, ale i v enkapsulované formě. Byl ověřován i účinek čistého gelu obsahující nisin a lysozym v koncentracích 2,5 mg/ml.

V Tabulce 13 jsou uvedeny výsledky. Lze vidět, že v krémech byly účinné látky zřejmě tak zředěné, že nevykazovaly při antimikrobiálním testu žádnou aktivitu ani na jeden kmen. Celkově u gelů byl prokázáný účinek pouze na grampozitivního zástupce bakterií. Nisin a lysozym se opět osvědčil spíše u grampozitivního zástupce, avšak požadovaný antimikrobiální účinek v menší míře vykazuje i na zástupce gramnegativních bakterií. Je tedy vhodný k posílení antimikrobiálního účinku i v gelech.

Z důvodu prokázaného antimikrobiálního účinku na grampozitivní bakterii byl vybrán ještě jeden zástupce těchto bakterií. Tímto zástupcem je *Propionibacterium Acnes*. Účinky nebyly tak vysoké jako na *M. Luteus*, avšak stále byly dostačující/prokazatelné. Tato bakterie se dá brát jako vzorový kmen na testování účinků proti akné, jelikož je původcem jeho tvorby [37]. Připravené gely s extrakty z medu, případně gely s liposomy s obsahem medových extraktů tak mohou nalézt uplatnění jako produkty proti akné. Jako nejvhodnější se dle dosažených výsledků jeví použití medu lučního.

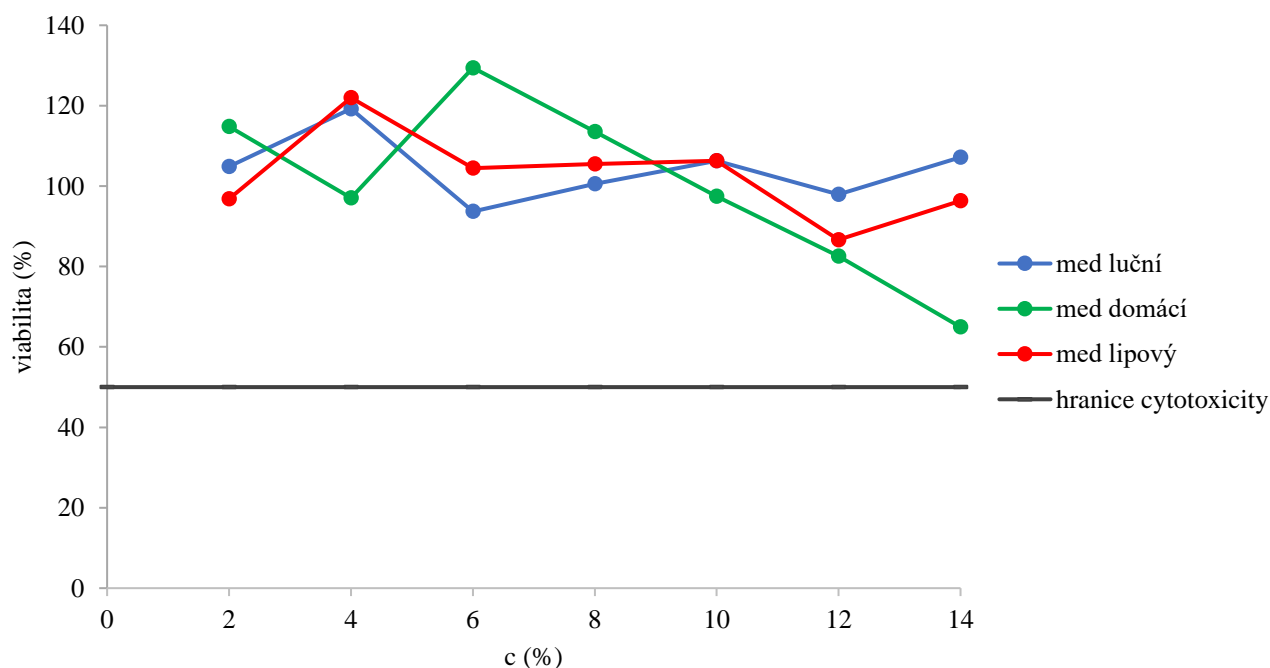
Tabulka 13: Antimikrobiální účinek připravených gelů a krémů

		<i>S. Marcescens</i>	<i>M. Luteus</i>	<i>P. Acnes</i>
KRÉMY	domácí	—	—	—
	lipový	—	—	—
	luční	—	—	—
GELY S EXTRAKTEM	domácí	—	+++	—
	lipový	—	+	++
	luční	—	++	++
GELY S LIPOSOMY	domácí	—	++++	—
	lipový	—	++++	+
	luční	—	++++	++
NISIN/LYSOSYM	c = 2,5 mg/ml	+	++++	+++

Antimikrobiální aktivita: (–) –∞-0 % (+) 0-20 %; (++) 20-50 %; (+++) 50-80 %; (++++) 80-100 %

5.6 MTT test cytotoxicity

Test cytotoxicity byl proveden na keratinocytech, a to podle postupu uvedeného v kapitole 4.13.2. Byly testovány liposomy připravené z výsledných extraktů vybraných typů medů. Výsledky shrnuje Graf 8. Z grafu je zřejmé, že hranici LD50 – tedy úhyn 50 % buněk a více – nepřekročil žádný z testovaných liposomů. Lze tedy říci, že připravené liposomy s enkapsulovanými extrakty medu lučního, lipového i domácího jsou vhodné pro aplikaci do kosmetických přípravků.



Graf 8: Výsledky MTT testu cytotoxicity

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo testování medu jako složky pro využití do kosmetických přípravků. Tato práce se zabývala přípravou a charakterizací extraktů medů, které byly posléze enkapsulovány do liposomů. Dále byly připraveny gely a krémy, u kterých byly testovány především antibakteriální účinky, ale i antioxidační aktivita. V teoretické části byla zpracována rešerše týkající se antioxidačních a antibakteriálních látek, včelích produktů, bakteriálních buněk, enkapsulace a charakterizace liposomů.

V experimentální části byla nejprve řešena optimalizace extrakce, kdy ve výsledku byl zvolen jako nejlepší rozpouštědlo diethylether v objemovém množství 3x40 ml. Toto rozpouštědlo bylo zvoleno s přihlédnutím k výsledkům ze stanovení množství celkových polyfenolů, sacharidů, antioxidační aktivity a enkapsulační účinnosti. Tato optimalizace byla prováděna na vzorku domácího medu. U výsledně vybraného způsobu extrakce v rámci optimalizace byl zaznamenán výborný úbytek množství cukrů a bylo stanoveno pouze $0,008 \pm 0,001$ mg/g. Na druhou stranu bylo stanoveno poměrně vysoké množství polyfenolů ($0,28 \pm 0,02$ mg/g) a vysoká antioxidační aktivita ($27,73 \pm 0,01$ μ g/g).

Následně byly srovnány extrakty tří různých medů (medu domácího, lipového a lučního). Nejnižší množství sacharidů bylo naměřeno v extraktu domácího medu ($0,008 \pm 0,001$ mg/g). Při stanovení celkových polyfenolů bylo dosaženo nejlepších výsledků u medu lipového ($0,39 \pm 0,004$ mg/g). Antioxidační aktivita pak byla u testovaných vzorků značně rozdílná. U medu domácího byla stanovena na $27,73 \pm 0,01$ μ g/g a u dalších dvou medů byl výsledek několikanásobně vyšší (med luční $238,64 \pm 0,02$ μ g/g). Největší množství flavonoidů obsahoval med domácí ($0,080 \pm 0,01$ mg/g), mezi jednotlivými medy však byly zaznamenány jen minimální rozdíly.

Extrakty byly následně enkapsulovány do liposomů. U liposomů byla stanovena enkapsulační účinnost, která se u všech testovaných medů při optimálních podmínkách pohybovala kolem 84 %. Následovalo stanovení antioxidační aktivity a dlouhodobé zachování antioxidační aktivity po dvou měsících skladování. Nejvyšší antioxidační aktivita náležela liposomům medu lučního ($18,79 \pm 0,4$ μ g/ml). Po dvou měsících byla antioxidační aktivita zcela zachována u liposomů s obsahem medu lipového. U liposomů z medu lučního došlo k drobnému poklesu antioxidační aktivity. U liposomů s obsahem extraktu z domácího medu pak došlo k významnějšímu poklesu antioxidační aktivity, kdy koncentrace antioxidantů klesla o více než 50%.

U liposomů byla stanovena velikost pomocí dynamického rozptylu světla. Velikost většiny liposomů se pohybovala v rozmezí 200–300 nm. V konečném srovnání mezi třemi typy liposomů s obsahem rozdílných medů, dosahoval v průměru nejmenší vytvořené částice med lipový ($204,1 \pm 4,3$ nm) a největší částice med domácí ($269,7 \pm 4,6$ nm). U všech liposomů byla stanovena také stabilita pomocí zeta potenciálu (následně i dlouhodobá stabilita po dvou měsících). Všechny připravené liposomy byly stabilní a stabilními zůstaly i po dvou měsících skladování.

Po vytvoření gelů a krémů byla stanovena jejich antioxidační aktivita. Antioxidační aktivita byla dle spektrofotometrického stanovení rovna nule. Příčinou byla zřejmě nízká koncentrace aktivních látek, jejich přítomnost však byla následně prokázána stanovením fenolických látek pomocí HPLC.

U přípravků byl sledován také antimikrobiální účinek. Gely byly vytvořeny z extraktů nebo liposomů vybraných vzorků medu. Antibakteriální účinek byl prokázán zejména na kmen grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus*. Z tohoto důvodu byl zvolen ještě jeden testovací zástupce grampozitivních bakterií, a tím byl *Propionibacterium acnes*. Antibakteriální účinek byl, ačkoliv v menší míře, prokázán i na tuto bakterii, a proto je využití extraktů z medu vhodné k aplikaci do kosmetiky proti akné. V rámci MTT testu prováděném na lidských

kožních buňkách bylo na závěr potvrzeno, že liposomy jsou ve všech použitých koncentracích vyhovující a necytotoxické, tedy jsou vhodné pro použití do kosmetiky.

Souběžně s gely obsahujícími izolované aktivní látky z medu, byl testován i čistý gel obsahující nisin a lysozym v koncentracích 2,5 mg/ml. Cílem bylo prokázat, že tyto látky vykazují antibakteriální účinky a zjistit, zda by byly tyto látky vhodné k posílení antibakteriálního účinku připravených kosmetických přípravků. Tento gel vykázal antibakteriální účinky taktéž převážně vůči kmenu grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus*, což se potvrdilo poté i při testování na *Propionibacterium acnes*. Bylo potvrzeno, že nisin a lysozym se hodí jako podpora antibakteriálního účinku i do kosmetických přípravků.

Za předpokladu využití připraveného kosmetického přípravku proti akné, navrhuji 2% gel připravený z extraktu nebo liposomů medu lučního. Tento gel vykazoval velmi dobré antibakteriální účinky nejen na *M. luteus*, ale taktéž na kmen *Propionibacterium acnes*, dosahoval i velmi dobré stability a vyhovujícího zastoupení obsažených fenolických látek.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SPÜRGIN, Armin. *Zázračné včely: od včelstva ke včelaření*. Líbeznice: Víkend, 2013. ISBN 978-80-7433-069-8.
- [2] TITĚRA, Dalibor. *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. Praha: Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vyd. nakl. Brázda, 2006. ISBN 80-209-0347-X.
- [3] AHNERT, Petra. *Včelí vosk: jak si vyrobit domácí svíčky, mýdla, balzámy, krémy, peeling*. V Praze: Metafora, 2018. ISBN 978-80-7359-545-6.
- [4] O mateří kašičce. *Včelí produkty Kolínek* [online]. [cit. 2019-01-17]. Dostupné z: <https://www.vceli-produkty.eu/vceli-produkty/o-materi-kasicce>
- [5] O propolisu. *Včelí produkty Kolínek* [online]. [cit. 2019-01-17]. Dostupné z: <https://www.vceli-produkty.eu/vceli-produkty/o-propolisu>
- [6] ZO ČSV České Budějovice. *Český med* [online]. [cit. 2019-01-17]. Dostupné z: http://www.vcelar.info/?page_id=259
- [7] ALTMAN, Nathaniel. *Med jako lék: zázračné léčivé vlastnosti včelího produktu*. Olomouc: Fontána, c2014. ISBN 978-80-7336-754-1.
- [8] ISLA, M., A. CORDERO, L. DÍAZ a P. VIT. *Cosmetics Properties of Honey* [online]. 2013, 1-8 [cit. 2019-05-13]. Dostupné z: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35292>
- [9] BURTON, G. W., D. O. FOSTER, B. PERLY, T. F. SLATER, I. C. P. SMITH, K. U. INGOLD, R. L. WILLSON a G. SCOTT. Biological Antioxidants [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1985, 2001, 311(1152), 565-578. DOI: 10.1098/rstb.1985.0164. ISSN 0962-8436. Dostupné také z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.1985.0164>
- [10] https://is.muni.cz/el/1411/jaro2004/BZKM021p/um/Prehled_antimikrobianich_latek.pdf
- [11] http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/fm/L9_Antimikrobiani_latky.pdf
- [12] CASCALES, E., S. K. BUCHANAN, D. DUCHE, et al. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2007, 71(1), 158-229 [cit. 2019-01-18]. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00036-06>
- [13] NETZ, Daili Jacqueline Aguilar, Hans-Georg SAHL, Rudy MARCOLINO, et al. Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus* 11. Edited by M. Yaniv. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2001, 311(5), 939-949 [cit. 2019-01-18]. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4885. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283601948855>
- [14] Význam a použití bakteriocinů. *Gate2Biotech - Biotechnologický portál - Vše o biotechnologiích na jednom místě*. [online]. [cit. 2019-01-18]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/vyznam-a-pouziti-bakteriocinu/>
- [15] BINDER, Michael, Antonín NEHYBA, Alexandra ŠALAKOVÁ a Vladimír SEDLAŘÍK. Vliv kultivačních podmínek na tvorbu nisinu při fermentaci syrovátky kmeny laktokoků. *Mlékařské listy*. 2015, (153).

- [16] Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria and Its Potential Applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* [online]. 30.4.2015, 53(32), 306-309 [cit. 2019-01-19]. ISSN 0976 – 044X. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/282176723_Bacteriocins_from_lactic_acid_bacteria_and_its_potential_applications
- [17] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [18] <http://fbt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/6-enzymy/>
- [19] MCKENZIE, Hugh A. a Frederick H. WHITE. Lysozyme and α -Lactalbumin: Structure, Function, and Interrelationships. *Advances in Protein Chemistry Volume 41* [online]. Elsevier, 1991, 1991, , 173-315 [cit. 2019-01-19]. *Advances in Protein Chemistry*. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60198-9. ISBN 9780120342419. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065323308601989>
- [20] BEDNÁŘ, M., V. FRANĚKOVÁ, J. SCHINDLER, A. SOUČEK a J. VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Triton, 1996. ISBN 978-80-9028-966-5.
- [21] HRSTKA, Miroslav. *Obecná biologie*. Vyd. 2. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. ISBN 978-80-214-3464-.
- [22] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [23] <http://docplayer.cz/11614922-Prokaryotické-organismy-rise-archebakterii-archaeobacteria-risi-eubakterii-eubacteria-s-podrisi-bakterie-bacteria-sinice-cyanobacteria.html>
- [24] HEJAZI, A. a F. R. FALKINER. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 1997, 46(11), 903-912 [cit. 2019-01-19]. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-46-11-903>
- [25] <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/serr.htm>
- [26] <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/micr.htm>
- [27] BOJAR, Richard A. a Keith T. HOLLAND. Acne and propionibacterium acnes. *Clinics in Dermatology* [online]. 2004, 22(5), 375-379 [cit. 2019-01-20]. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2004.03.005. ISSN 0738081X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X04000380>
- [28] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, 1(5), 1806-1815 [cit. 2019-01-20]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. ISSN 2211601X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [29] GOUIN, Sébastien, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. Microencapsulation. *Procedia Food Science* [online]. 2004, 15(7-8), 330-347 [cit. 2019-01-20]. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.10.005. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224403002723>

- [30] WANG, Binghe, Teruna SIAHAAN a Richard SOLTERO. *Drug delivery: principles and applications*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2005. ISBN 04-714-7489-4.
- [31] MATHIOWITZ, Edith, Teruna SIAHAAN a Richard SOLTERO. *Encyclopedia of controlled drug delivery: principles and applications*. New York: John Wiley, c1999. ISBN 978-0-47114828-9.
- [32] *Dynamický rozptyl světla* [online]. [cit. 2019-01-20]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [33] MALVERN INSTRUMENTS Ltd., Manual: Zetasizer Nano user manual (Man03175.0) inc addendum, United Kingdom, 2009
- [34] *Zeta potenciál zeta* [online]. [cit. 2019-01-20]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [35] [Základní techniky práce s tkáňovými kulturami. Ústav lékařské chemie a biochemie [online]. [cit. 2019-05-13]. Dostupné z: <http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>]
- [36] https://theses.cz/id/t76kdl/zaverecna_prace.pdf
- [37] [SANFORD, J. A., L.-J. ZHANG, M. R. WILLIAMS, J. A. GANGOITI, C.-M. HUANG a R. L. GALLO. Inhibition of HDAC8 and HDAC9 by microbial short-chain fatty acids breaks immune tolerance of the epidermis to TLR ligands. *Science Immunology* [online]. 2016, 1(4), eaah4609-eaah4609 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1126/sciimmunol.aah4609. ISSN 2470-9468. Dostupné z: <http://immunology.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/sciimmunol.aah4609>